

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin

Abteilung für Kinderkardiologie

und dem

Institut für Pathologie der Charité, Campus Mitte

Universitätsklinikum der Humboldt-Universität zu Berlin

**Hemmung der Selektin-vermittelten  
Granulozytenadhäsion durch Fucoidin in der frühen  
Reperfusionsphase nach Ischämie im Modell der  
ex-vivo hämoperfundenen Schweineniere**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von Frank Lippek

aus Bremen

Dekan: Prof. Dr. med. h.c. R. Felix

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. P.-E. Lange

2. Prof. Dr. med. C. Bühner

3. Prof. Dr. med. H. Lobeck

Eingereicht am: 06.12.2000

Datum der Promotion: 09.07.2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
1.1	DER RENALE ISCHÄMIE-/REPERFUSIONSSCHADEN.....	4
1.2	PATHOPHYSIOLOGIE DES RENALEN ISCHÄMIE-/REPERFUSIONSSCHADENS.....	4
1.3	ADHÄSIONSMOLEKÜLKASKADE.....	6
1.3.1	„Rolling“.....	7
1.3.2	„Tethering“.....	7
1.4	SELEKTINE.....	9
1.4.1	Allgemeines.....	9
1.4.2	L-Selektin.....	10
1.4.3	E-Selektin.....	10
1.4.4	P-Selektin.....	11
1.4.5	sSelektine.....	12
1.4.6	Selektin-Liganden.....	12
1.4.7	Selektinblockade in der frühen Reperfusionsphase nach Ischämie.....	13
1.4.8	Selektinblockade durch monoklonale Antikörper.....	13
1.5	FUCOIDIN.....	14
1.5.1	Allgemeines.....	14
1.5.2	Zusammensetzung von Fucoidin.....	15
1.5.3	Antikoagulatorische Potenz von Fucoidin.....	15
1.5.4	Einsatz von Fucoidin zur Selektinblockade.....	15
<b>2</b>	<b>HYPOTHESE UND ZIEL DER ARBEIT.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>19</b>
3.1	VERSUCHSBEDINGUNGEN.....	19
3.2	ORGAN- UND BLUTGEWINNUNG AM SCHLACHTHOF.....	20
3.3	ORGAN- UND BLUTGEWINNUNG IM OP.....	21
3.4	VERSUCHSAUFBAU.....	22
3.5	VERSUCHSABLAUF.....	26
3.6	BLUTVISKOSITÄTSMESSUNG.....	29
3.7	FAKTOR XA-AKTIVITÄTSTEST.....	29
3.8	HISTOLOGISCHE METHODEN.....	29
3.8.1	Gewebeasservierung.....	29
3.8.2	Konventionelle Färbungen.....	29
3.8.3	Immunhistologische Färbungen.....	30
3.8.3.1	CD45.....	30
3.8.3.2	Fibrinogen.....	30
3.8.4	Histologische Auswertung.....	31

3.8.4.1	Granulozytenzählung .....	31
3.8.4.2	CD45-positive Leukozyten .....	32
3.8.4.3	Fibrinogen.....	32
3.8.4.4	Mikroembolien.....	33
3.9	STATISTISCHE BERECHNUNGEN .....	33
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
4.1	KLINISCHE PARAMETER.....	34
4.1.1	<i>Ischämiezeiten und Gewicht .....</i>	<i>34</i>
4.1.2	<i>Vaskulärer Widerstand, Blutfluss, Sauerstoffverbrauch.....</i>	<i>34</i>
4.2	RENALE HISTOLOGIE .....	38
4.2.1.1	Neutrophile Granulozyten .....	38
4.2.1.2	CD45-positive Leukozyten .....	40
4.2.1.3	Fibrinogen.....	43
4.2.1.4	Mikroembolien.....	44
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENSLAUF .....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>67</b>

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMA DER ADHÄSIONSMOLEKÜLKASKADE .....	8
ABBILDUNG 2: DIE DREI MITGLIEDER DER SELEKTINFAMILIE .....	11
ABBILDUNG 3: FUCUS VESICULOSUS (BLASENTANG) .....	14
ABBILDUNG 4: SCHEMA PERFUSIONSMODELL .....	24
ABBILDUNG 5: PERFUSIONSAUFBAU .....	25
ABBILDUNG 6: DIE NIERE WÄHREND DER REPERFUSION .....	25
ABBILDUNG 7 KLINISCHE PARAMETER: VASKULÄRER WIDERSTAND, RENALER BLUTFLUSS, KREATININ-CLEARANCE, NATRIUMTRANSPORT UND SAUERSTOFFVERBRAUCH. ....	37
ABBILDUNG 8: DIAGRAMM GRANULOZYTENZÄHLUNG .....	39
ABBILDUNG 9: DIAGRAMM CD45-POSITIVE LEUKOZYTEN .....	41
ABBILDUNG 10: CD45-POSITIVE LEUKOZYTEN IN KONTROLLEN UND FUCOIDINNIEREN. ....	42
ABBILDUNG 11: FIBRINOGEN IN KONTROLLEN UND FUCOIDINNIEREN .....	43
ABBILDUNG 12: GRANULOZYTÄRE MIKROEMBOLIEN IN KONTROLLEN UND FUCOIDINNIEREN. ....	45

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PHASEN DER ADHÄSIONSMOLEKÜLKASKADE .....	6
TABELLE 2: TIERMODELLE .....	16
TABELLE 3: ZEITLICHER ABLAUF SCHLACHTHOFNIEREN .....	21
TABELLE 4: ZEITLICHER ABLAUF OP-NIEREN .....	22
TABELLE 5 (A): GEMESSENE PARAMETER .....	26
TABELLE 6 (B): GEMESSENE PARAMETER .....	27
TABELLE 7: BERECHNETE PARAMETER UND FORMELN .....	27
TABELLE 8: DIALYSATLÖSUNG (MODIFIZIERTE TYRODELÖSUNG) .....	28
TABELLE 9: ZUSAMMENSETZUNG DER KONSERVIERUNGSLÖSUNG .....	28
TABELLE 10: AUSWERTUNGSPARAMETER FÜR NEUTROPHILE GRANULOZYTEN .....	31
TABELLE 11: AUSWERTUNGSPARAMETER FÜR CD45-POSITIVE LEUKOZYTEN .....	32
TABELLE 12: FIBRINOGENDARSTELLUNG .....	32
TABELLE 13 (A): KLINISCHE PARAMETER .....	35
TABELLE 14 (B): KLINISCHE PARAMETER .....	36
TABELLE 15: GRANULOZYTENZÄHLUNG .....	38
TABELLE 16: CD45-POSITIVE LEUKOZYTEN .....	40
TABELLE 17: MIKROEMBOLIEN .....	44

# **1 Einleitung**

## **1.1 Der renale Ischämie-/Reperfusionsschaden**

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden der Niere stellt in der Transplantationsmedizin ein besonderes Problem dar [1, 2]. In maximaler Ausprägung führt der Ischämie-/Reperfusionsschaden zu einem Verlust der Organfunktion, in leichter Ausprägung zur Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion [1]. Die Dauer der Ischämie hat einen grossen Einfluss auf die postischämische Organfunktion, da Nierentransplantate mit langer Ischämie vermehrt akute Rejektionsphasen sowie späte vaskuläre und glomeruläre Veränderungen aufweisen, als solche mit kurzer Ischämie [3, 4]. Ferner ist die Reperusionsphase, in der es zur Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen, Zytokinen, sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen kommt [5-14], ein wichtiger Faktor für eine gute Transplantatfunktion. Ergänzend sei zu erwähnen, dass auch andere Faktoren, wie z. B. der initiale (Re-) Perfusionsdruck einen Einfluß auf die postischämische Organfunktion nehmen können [15, 16].

## **1.2 Pathophysiologie des renalen Ischämie-/Reperfusionsschadens**

Als Ursache des Ischämie-/Reperfusionsschadens ist nicht allein der Mangel an Sauerstoff zu sehen, es handelt sich dabei vielmehr um einen Komplex verschiedener Mechanismen [17, 18]. Dabezeichnet sich die Phase der Ischämie durch einen schnellen Abfall der intrazellulären Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentration aufgrund fehlender oxidativer Phosphorylierung aus. Da die Versorgung der Zelle mit Energie über die anaerobe Glykolyse nur kurzfristig sicher gestellt werden kann, steigt in Folge die intrazelluläre Laktatkonzentration und es kommt zu einem konsekutiven Abfall des pH-Wertes, sowie zu einem Ausfall der Natrium/Kalium-ATPase mit Einstrom von Natrium, Calcium und Wasser, dem osmotischen Gefälle folgend, in die Zelle [18]. Eine lichtmikroskopisch fassbare vakuolige Degeneration, sowie eine hydropische Schwellung aufgrund eines Ödems der Tubulusepithelien [19, 20], sind die Folgen.

In der Phase der Reperfusion spielen freie Sauerstoffradikale [5, 21, 22] eine wichtige Rolle. Experimentelle Arbeiten konnten die Wichtigkeit freier Sauerstoffradikale, welche durch aktivierte Xanthinoxidase während der Reperfusionsphase freigesetzt werden, an kältekonserverten Nierentransplantaten aufzeigen [5, 23, 24]. Freie Sauerstoffradikale führen zu einer Peroxidationsreaktion von Lipiden, Depolymerisation von Polysacchariden und Degeneration von Desoxyribonucleotiden [10, 25].

Geschädigte Endothelien verlieren dadurch ihre Fähigkeit zur Dilatation der glatten Muskulatur der Hämangien und setzen potente Vasokonstriktoren frei [17]. Die Kombination aus Vasokonstriktion, hydropischer Zellschwellung und extrazellulärem Ödem kann eine Organdysfunktion zur Folge haben [19, 26, 27].

Neutrophile Granulozyten fließen aufgrund ihrer Grösse und geringeren Elastizität langsamer durch Mikrogefäße als Erythrozyten. So kann es bei granulozytärer Aktivierung und gesteigerter Adhärenz im Rahmen von Blutdruckabfall, Sistieren des Blutflusses oder bei ischämischen Ereignissen in Mikrogefäßen leicht zu einer Aggregation von Granulozyten kommen, was zu einer gestörten Durchblutung und zum Mikroperfusionsschaden [28] führt.

Eine zusätzliche Expression proinflammatorischer Zytokine [9, 29, 30], sowie zellulärer Adhäsionsmoleküle [11, 12, 14] bewirkt eine leukozytäre Aktivierung, mit konsekutiver Steigerung der Zell-Zell-Adhärenz. Dieses Phänomen verstärkt die gestörte Durchblutung und potenziert somit den bestehenden hypoxischen Gewebeschaden [28].

### 1.3 Adhäsionsmolekulkaskade

Die Bindung von Leukozyten an Endothelien, läuft in einer Kaskade ab, an der unterschiedliche Mediatoren, die Adhäsionsmoleküle, beteiligt sind. Diese lassen sich nach heutigem Kenntnisstand in vier Gruppen, die sogenannten Protein- oder Gensuperfamilien einordnen:

Selektine, Immunglobuline, Integrine und Cartilage-Link-Proteine.

Die einzelnen „Familienmitglieder“ zeichnen sich durch charakteristische Homologien in ihrer Aminosäuresequenz aus, die innerhalb der Eiweißmoleküle erkennbare strukturelle Einheiten, sogenannte Domänen, bilden. Viele dieser genetisch festgelegten Domänen lassen sich bis in die frühe Evolution zurückverfolgen. Durch die charakteristischen, bindungsrelevanten Domänen innerhalb eines Proteins ist zu erkennen, welcher Proteinsuperfamilie es angehört [31]. Die Adhäsionsmolekulkaskade lässt sich in 4 Phasen, an denen unterschiedliche Moleküle beteiligt sind, einteilen. Nachfolgend soll die Aufmerksamkeit auf die Selektine und die frühen Selektin-vermittelten Phasen, das sog. „Rolling“ und „Tethering“, der Leukozytenadhäsion gerichtet werden.

Tabellarische Aufführung der Adhäsionsmolekulkaskade:

Phase	Adhäsionsmoleküle	Funktion
Rolling	<i>Selektine</i>	<i>Margination</i> der Leukozyten
Tethering	<i>Selektine</i>	<i>Erster lockerer Zellkontakt</i> zwischen Leukozyten und Endothelzellen
Sticking	Integrine	<i>Stabile Zelladhäsion</i> zwischen Leukozyten und Endothelzellen
Transendotheliale Migration	Integrine	<i>Gewebeinfiltration</i> durch Leukozyten

Tabelle 1: Phasen der Adhäsionsmolekulkaskade



### **1.3.1 „Rolling“**

Während der Reperfusion kommt es initial zu einer Selektin-vermittelten Margination von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten, unter Beteiligung von Komplement C1q und C5a. Die Granulozyten verlassen ihre zentrale Position in der Blutstrombahn und nähern sich der Gefäßwand, an der sie langsam vorbeierollen. Dieses Phänomen lässt sich 20 bis 30 Minuten nach chirurgischer Präparation mittels Intravitalmikroskop in Mesenterialgefäßen von Kaninchen und Ratten sowie in Hämangien von Hamsterbacken nachweisen [32]. Die Rollgeschwindigkeit der Granulozyten beträgt dabei 20 bis 50  $\mu\text{m/s}$  bei einer Blutflussgeschwindigkeit von 1 bis 5  $\text{mm/s}$  [32, 33]. Die Reduktion der Geschwindigkeit ist bedingt durch die Dichte der zellulär exprimierten Selektine bzw. der Dichte ihrer Liganden.

### **1.3.2 „Tethering“**

Auch am ersten lockeren, reversiblen Kontakt zwischen den neutrophilen Granulozyten und dem Gefäßendothel sind Mitglieder der Selektin-Familie beteiligt [11, 12, 14, 34-38]. Durch diesen lockeren Kontakt wird die Expression von weiteren Zelladhäsionsmolekülen (Integrine) induziert, welche die spätere stabile Zelladhäsion vermitteln. Findet diese Induktion z.B. aufgrund einer fehlenden Freisetzung von Integrin-aktivierenden Substanzen nicht statt, lösen die auf dem Endothel rollenden Granulozyten ihre lockere Bindung wieder und zirkulieren weiter [39-41].

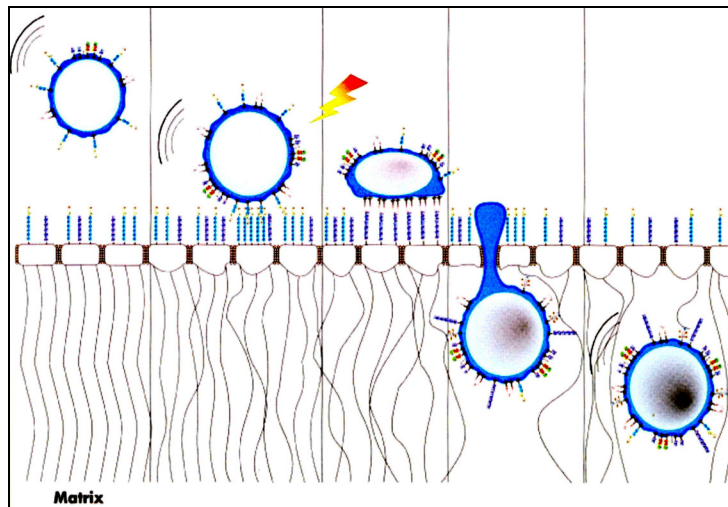


Abbildung 1: Schema der Adhäsionsmolekülkaskade

(Abbildung aus F. Klaschka, Neue Perspektiven in der Tumorthherapie, 1996, FORUM – MEDIZIN Verlagsgesellschaft mbH, ISBN 3-910075-16-9 S. 149)

Während der ersten beiden Phasen („Rolling“ und „Tethering“) wird über die Selektine ein erster Kontakt zwischen Immunzelle und Endothel hergestellt. Dabei kann die Expressionsdichte durch lokale Entzündungsmediatoren auf dem Endothel erhöht sein. Vorbeiziehende Immunzellen beginnen auf dem Endothel entlangzurollen, wobei die Selektine als eine Art „Leitstrahl“ dienen, um die Immunzellen an den Ort des Geschehens heranzuführen, ohne sie dabei wesentlich zu aktivieren. Ab einer bestimmten Anzahl von „Selektin-Kontakten“ erfolgt eine Aktivierung der Immunzelle („Blitz“ in der Abbildung).

An der dritten und vierten Phase („Sticking“ und „Migration“) sind weitere Adhäsionsmoleküle aus den Familien der Integrine, wie LFA-1 (Leukozytenfunktionsantigen-1), und Immunglobuline wie ICAM-1 und -2 (Intercellularadhaesionmolekul-1 und -2) beteiligt. Die Immunzelle exprimiert LFA-1 und bindet über diesen Rezeptor am ICAM-1 des Endothels. Dabei kann die ICAM-1-Dichte auf der Endotheloberfläche durch Entzündungsmediatoren bereits hoch sein oder wird durch Zytokinexpression auf der Immunzelle hochgefahren.

Aufgrund von im direkten Zell-zu-Zell-Kontakt übermittelter Signale weichen die Endothelzellen auseinander und geben so der Immunzelle den Weg aus der Gefäßbahn frei. Daran schließt sich eine direkte Wanderung der Immunzelle entlang der extrazellulären Matrix zum Entzündungsfokus an, verbunden mit einer weiteren Zunahme der Expressionsdichte von Matrixadhäsionsmolekülen (Integrine, Cartilage-Link-Proteine). Die finale Aktivierung der Immunzelle, z.B. der zytotoxischen Funktion, geschieht normalerweise erst dann, wenn die Immunzelle ihren Einsatzort erreicht hat.

## **1.4 Selektine**

### **1.4.1 Allgemeines**

Selektine vermitteln das granulozytäre „Rolling“ und „Tethering“. Dabei erkennt jedes Selektin Liganden mit spezifischen Karboanhydratsequenzen entweder auf Leukozyten (E-, P–Selektin) oder auf Endothelien (L–Selektin). Selektine unterscheiden sich im wesentlichen durch ihre Kettenlänge. Dabei besitzen Selektine lange extrazelluläre Domänen, mit denen es ihnen gut gelingt, vorbeikommende Leukozyten mit entsprechender Rezeptorexpression zu binden.

Die drei Vertreter der Selektingruppe sind nach den Zelltypen, auf denen sie zuerst beschrieben wurden - **L**ymphozyten, **E**ndothelzellen, **P**lättchen - benannt. Am besten erforscht ist dabei das L-Selektin, über P-Selektin ist wenig bekannt.

### 1.4.2 L-Selektin

L-Selektin (auch CD62L) wird von den meisten Leukozyten konstitutionell exprimiert und fungiert als „homing receptor“ in Lymphknoten. CD62L bewirkt dabei die initiale Adhäsion von Lymphozyten an hohen endothelialen Venolen in peripheren Lymphknoten sowie eine initiale endotheliale Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in entzündlichen Geweben [42]. L-Selektin hat eine molekulare Masse von 74 kiloDalton (kDa) auf Lymphozyten und von 95 kDa auf neutrophilen Granulozyten.

Es besteht aus 444 Aminosäuren. CD62L auf neutrophilen Granulozyten, nicht aber auf Lymphozyten trägt eine Sialyl-Lewis-X (sLe<sup>x</sup>)-Karbhydratstruktur [43], welche als Ligand für P-, und E-Selektin dient. Der extrazelluläre Teil von L-Selektin beinhaltet Domänen für Lektine und epidermalen Wachstumsfaktor [36]. Diese Domänen können auch L-Selektin-Liganden auf Endothelien, welche sialylierte, fucosilierte und/oder sulphatierte Oligosaccharide in Glykoproteinen und Glykolipiden tragen, binden. Interferon-Alpha (IFN-alpha) bewirkt eine Hochregulation der Oberflächenexpression von L-Selektin auf Leukozyten. Die Downregulation der L- (auch P- und E-) Selektinexpression geschieht zum Teil über proteolytische Spaltung und nachfolgendem „shedding“ von löslichem (soluble) Selektin (sL-, sP-, sE-Selektin) [44].

### 1.4.3 E-Selektin

E-Selektin (CD62E) ist ein 110 kDa schweres Glykoprotein, welches von Endothelien nach vorhergehender Aktivierung durch Zytokine, wie Tumornekrose Faktor-Alpha (TNF-Alpha) [45-48] exprimiert wird. Auch Lipopolysaccharide bewirken eine vermehrte E-Selektin-Expression [11]. Hypoxie scheint dagegen keinen Einfluss auf die Expressionsdichte von E-Selektin zu haben [45]. E-Selektin dient als Adhäsionsmolekül für Lymphozyten und neutrophile Granulozyten in entzündlichen Prozessen [35, 36, 45]. Die Degradation der Oberflächenexpression von E-Selektin geschieht über Endozytose und intralysosomale Proteolyse, sowie über proteolytische Abspaltung („shedding“) der löslichen Anteile. Ein bekannter Ligand von E-Selektin ist die sLe<sup>x</sup>-Karbhydratstruktur des CD62L auf neutrophilen Granulozyten [49-51].

#### 1.4.4 P-Selektin

P-Selektin (CD62P) ist ein 140 kDa schweres transmembranöses Glykoprotein, welches auf aktivierten Endothelien, aktivierten Thrombozyten und Megakaryozyten nachweisbar ist. P-Selektin wird in nicht aktivierten Plättchen und Endothelzellen in Weibel–Palad-Körperchen gespeichert und kann nach Aktivierung (z.B. durch Thrombin) innerhalb von 10 bis 15 Minuten auf der Zelloberfläche erscheinen [38]. Die Downregulation geschieht auch hier zum Teil über „shedding“. CD62P dient nach Expression als Rezeptor für neutrophile Granulozyten und Monozyten [52-55] und trägt ebenfalls eine sLe<sup>x</sup>-Kohlenhydratstruktur innerhalb seiner extrazellulären Domänen.

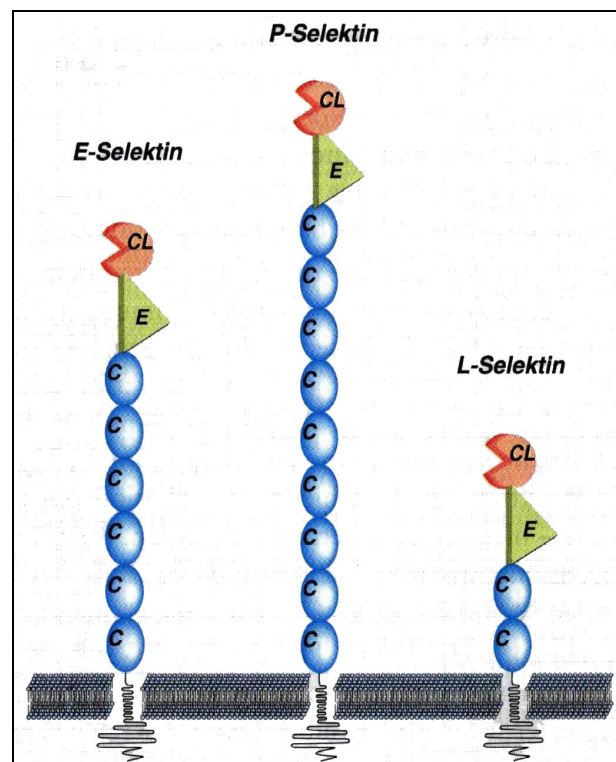


Abbildung 2: Die drei Mitglieder der Selektinfamilie

(Abbildung aus F. Klaschka, Neue Perspektiven in der Tumorthherapie, 1996, FORUM – MEDIZIN Verlagsgesellschaft mbH, ISBN 3-910075-16-9 S. 142)

#### **1.4.5 sSelektine**

Alle drei Selektine zeigen eine lösliche („soluble“) Isoform. Die Bestimmung der Konzentration im Plasma zirkulierender sSelektine kann diagnostische Wichtigkeit besitzen. So werden z.B. 2-3fach erhöhte sP-Selektinwerte im Plasma bei Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom beobachtet. Ein sE-Selektinanstieg ist bei Patienten mit Sepsis zu verzeichnen, ein Anstieg von sL-Selektin dagegen bei AIDS und Leukämie. Patienten mit adult respiratory distress syndrome (ARDS) zeigen signifikant verringerte sL-Selektinwerte [56, 57].

#### **1.4.6 Selektin-Liganden**

Es ist bekannt, dass sLe<sup>x</sup> oder dessen Varianten ein determinierendes Oligosaccharid auf Liganden für L-, P- und E-Selektine ist [49, 58]. Allerdings ist die spezifische Rolle von sLe<sup>x</sup> bei der Selektinerkennung noch nicht geklärt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Liganden von L-Selektin Sulfat beinhalten [59]. Neuraminidase ist in der Lage, die Bindung zwischen L-Selektin und Ligand zu inhibieren [49]. L-Selektin-Liganden sind resistent gegen Hitze, Proteasen und ionische Detergentien [60]. Für L-Selektin sind verschiedene Liganden auf Endothelzellen identifiziert, GlyCAM-1 (Glycosylation-dependent-Cell-Adhesion-Molecule-1) [61], MAdCAM-1 (Mucosal-Adressin-Cell-Adhesion-Molecule-1) [42], CD34 [61] und Sgp50 [62]. Ein funktioneller Ligand für P-Selektin ist der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1). PSGL-1 wird auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert. Seine Interaktion mit P-Selektin ist Calcium-abhängig und es scheint die Anwesenheit einer sLe<sup>x</sup>-Struktur nötig zu sein [54].

#### **1.4.7 Selektinblockade in der frühen Reperfusionsphase nach Ischämie**

Die Identifikation der Karbohydratase-Liganden der Selektine eröffnet die Möglichkeit der Entwicklung neuartiger antiinflammatorischer Substanzen [36]. So konnte gezeigt werden, dass sLe<sup>x</sup>, ein Teil des Karbohydrat-Liganden der Selektine, einen effektiven Antagonist der Selektinfunktion darstellt. sLe<sup>x</sup> ist ein Tetramer, welches N-Acetylneuraminsäure, Galactose, N-Acetylglucosamin und Fucose enthält [63].

#### **1.4.8 Selektinblockade durch monoklonale Antikörper**

An postkapillaren Venolen von Mäusen konnte durch E-Selektin-Blockade eine komplette Inhibition der Granulozytenadhäsion erreicht werden, eine L-Selektin-Blockade dagegen bewirkte eine 70%ige Reduktion der Granulozytenadhäsion [34] nach Ischämie und Reperfusion. Eine E- und L-Selektin-Blockade bewirkte im Rattenmodell eine signifikante Reduktion der granulozytären Infiltrate in postkapillaren Venolen nach mesenterialer Ischämie und Reperfusion [64]. Diese Beobachtungen konnten an Katzenherzen [65] bestätigt werden. Hier wurde ein positiver Effekt durch gegen L-Selektin gerichtete monoklonale Antikörper auf die postischämische Organfunktion beobachtet. Am Kaninchenohr [66] war durch Antikörper gegen E- und L-Selektin eine signifikante Reduktion der granulozytären Infiltrate im Gewebe nach Ischämie zu verzeichnen. Auch an Rattenleber [67], Rattenniere [68], humanen Endothelzellen [69], Hundeherzen [63] und Rattenlunge [70] ließen sich diese Beobachtungen bestätigen. Neben monoklonalen Antikörpern stellt ein aus Meeresalgen gewonnenes Fucose-Oligosaccharid, Fucoidin, einen weiteren Ansatz zur Selektinblockade dar.

## 1.5 Fucoidin

### 1.5.1 Allgemeines

Fucoidin ist ein aus dem braunen Blasentang (*Fucus vesiculosus*) gewonnenes, nicht toxisches, sulfatiertes Fucose–Oligosaccharid [71, 72].



Abbildung 3: *Fucus vesiculosus* (Blasentang)

(Abbildung aus: <http://www.gudjons.com/Mittel/Fucus-vesic.html>)

*Fucus vesiculosus* (Fam. nat. Phaeophyceae) wird in der Nord- und Ostsee sowie an den Atlantikküsten Europas südlich bis zur Biscaya gefunden. Blasentang ist aus der Phytotherapie bekannt und wurde bereits im 18. Jahrhundert bei Hautkrankheiten und Asthma eingesetzt. Wegen seines hohen Jodgehaltes wird Blasentangextrakt zum Teil bei Jodmangelstruma verwendet. Blasentang enthält neben Jod essentielle und freie Fettsäuren, Pektine, Mineralsalze (Chlor, Kalium, Eisen, Phosphor) sowie Fucoidin [73].



### **1.5.2 Zusammensetzung von Fucoidin**

Fucoidine sind eine Familie von hochmolekularen sulfatierten Polysacchariden. Fucoidin beinhaltet ein weites Spektrum an Fucanen, welche hauptsächlich aus Fucose und Sulfaten bestehen. Bei einem kleineren Teil der Fucane handelt es sich um niedermolekulare Sulfate beinhaltende Heteropolysaccharide, mit hohem Anteil an neutralen Zuckern und Uronsäure [72]. Das Molekulargewicht der Fucoidine reicht von  $8 \cdot 10^5$  bis  $8 \cdot 10^6$  kDa [74]. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fucoidin (Sigma, Deisenhofen, BRD [F5631]) handelt es sich um ein Polysaccharid, welches überwiegend aus sulfatierter Fucose besteht. Es beinhaltet 6-8% Natrium, 7-11% Schwefel und 1% Calcium. Das Molekulargewicht beträgt 193 kDa [75].

### **1.5.3 Antikoagulatorische Potenz von Fucoidin**

Fucoidin besitzt über die Hemmung von Faktor IIa und Faktor Xa bei Anwesenheit von Antithrombin III und Heparin-Cofaktor II antikoagulatorische Potenz [74]. Fucoidin hat die Fähigkeit zur Thrombolyse über eine Interaktion mit dem Plasminogen-Aktivator (t-PA) und inhibiert die Hyaluronsäure-vermittelte Fibrinthrombenbildung [74]. Diese Beobachtungen konnten in weiteren Studien zur antithrombotischen und antikoagulatorischen Potenz von Fucoidin bestätigt werden [76-78].

### **1.5.4 Einsatz von Fucoidin zur Selektinblockade**

Fucoidin besitzt die Potenz zur Blockade der frühen Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion, insbesondere von L- und E-Selektinen [79]. Diese Potenz wird über eine strukturelle Analogie von Fucoidin mit den sulfatierten Karboanhydratasen der Selektin-Liganden erklärt [71]. Über die Wirksamkeit von Fucoidin zur Selektinblockade gibt es verschiedene Studien, durchgeführt an diversen Säugetierspezies und -organen.

<b>Säugetierspezies</b>	<b>Organ(e)</b>
Maus	Ohr [80]
Maus	Muskel [47]
Maus	Schilddrüse [81]
Maus	Generalisiert [82]
Ratte	Mesenterium [83]
Ratte	Magen [84]
Ratte	Lunge [85]
Ratte	Leber [86]
Ratte	Parotis [87]
Ratte	Gehirn [88]
Ratte	Herz [89, 90]
Lamm	Herz [91]
Katze	Herz [92]
Katze	Venolen [55]
Kaninchen	Lunge [93]
Schwein	Arteria carotis [94]

Tabelle 2: Tiermodelle

In den Mausmodellen konnte eine Hypersensibilitätsreaktion des Ohres durch Fucoidin deutlich reduziert werden [80]. Der Neutrophileninflux des Cremastermuskels nach Ischämie und Reperfusion, ebenfalls im Mausmodell, konnte durch Fucoidin reduziert werden [47]. Weiterhin waren an der Maus eine deutliche Reduktion der entzündlichen Infiltration nach experimenteller Schilddrüsentransplantation [81], sowie eine verringerte Selektinaktivierung beim septischen Schock [82] unter Fucoidin zu

beobachten.

Bei der Ratte zeigte sich, dass Fucoidin in Ischämie-/Reperfusions-Versuchen der Lunge [85], sowie des Herzens [89, 90] eine Reduktion des Ausmaßes der Leukozyteninfiltration im betroffenen Gewebe bewirkt. Des Weiteren stellt sich Fucoidin bei der durch Pneumokokken induzierten Meningitis als potenter Inhibitor des Neutrophilen-Influx dar [88] dar.

Am isoliert hämoperfundierte Lämmerherzen war, nach 2stündiger kalter Ischämie und anschließender Reperfusion, unter Fucoidin eine verbesserte postischämische Funktion nachzuweisen [91]. Nach 60minütiger Ischämie und anschließender Reperfusion war im Katzenmodell durch Fucoidin eine 90prozentige Reduktion des Leukozyten-rollings in postischämischen Venolen zu beobachten [55].

Fucoidin stellte sich des Weiteren als potentieller Inhibitor des Neutrophilen-Influx bei chemisch induzierter Lungenentzündung im Kaninchenmodell [93] dar. Für das Schwein gibt es bis dato nur eine Publikation, in der eine Reduktion der leukozytären Infiltrate nach experimenteller Angioplastie der Arteria carotis communis beschrieben wird [94].

## **2 Hypothese und Ziel der Arbeit**

Fucoidin stellt sich nach bisherigen Forschungsergebnissen in diversen Säugetierspezies und -organen als potenter Inhibitor der Selektin-vermittelten Granulozytenadhäsion in ischämisch geschädigten Geweben dar. Die Substanz wurde bis dato aber erst einmal im Schweinmodell [94] getestet. Über die Wirksamkeit von Fucoidin im Rahmen des renalen Ischämie-/Reperfusionsschaden sind keine Forschungsergebnisse erhältlich. Zwischen den oben genannten Organen scheint eine unterschiedliche Kinetik der Zelladhäsion zu bestehen, möglicherweise bedingt durch eine organspezifische Sensibilität gegenüber proinflammatorischen Zytokinen [35, 36]. Des Weiteren zeichnet sich die Niere durch die anatomische Besonderheit zweier hintereinander geschalteter Kapillarsysteme mit besonderen Blutflusseigenschaften aus. Daher erscheint es um so interessanter, die Niere und ihre Funktion im Rahmen des experimentellen Einsatzes von Fucoidin zur Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion in der frühen Reperusionsphase zu beurteilen. Getestet wurde dies in einem Modell der autolog hämoperfundierte Schweineniere.

### **3 Methoden**

#### **3.1 Versuchsbedingungen**

Die Selektinblockade mittels Fucoidin in der frühen Reperfusionphase nach Ischämie wurde in einem vorab beschriebenen Modell der isoliert hämoperfundierte Schweineniere getestet [95, 96]. Um die Wirkung der Substanz nach langer und kurzer Ischämie untersuchen zu können, wurden 2 Versuchsgruppen (je 6 Nieren) und 2 Kontrollgruppen (5 bzw. 7 Nieren) mit kurzer (15 Minuten) und langer (7 Stunden) Ischämie gebildet. Durchgeführt wurden 24 Versuche. Die Schweine (Deutsche Landrasse) für die Gruppen der langen Ischämie stammten aus gewerblicher Schlachtung (Eberswalder Schlachthof GmbH). Bei den Tieren für die Gruppen der kurzen Ischämie handelte es sich um OP-Tiere, die entsprechend den Richtlinien der National Academy of Science gehalten [97] wurden. Das verwendete autologe Vollblut wurde, wie in der Kardiochirurgie beim Einsatz der Herz-/Lungenmaschine üblich, moderat diluiert [98].

Dem Blut der Versuchsgruppen wurde vor Beginn der Reperusionsphase Fucoidin in einer Konzentration von 100mg/l zugesetzt. Dafür wurden Portionen von 50 mg Fucoidin (No F-5631 LOT 56H3799 [9072-19-99], Sigma, Deisenhofen, BRD) in 5 ml Aqua dest. gelöst, durch einen 0,2 µm Filter filtriert, aliquotiert und bis zum Einsatz bei -80°C gelagert. Die Ermittlung der verwendeten Fucoidin - Dosierung erfolgte nach Literaturrecherche. Die effektive Dosis (ED 50) wurde dabei mit 2,1 bis 2,5 mg/l beschrieben [32, 99]. Ein therapeutischer Effekt mit einer 90%igen Inhibition der Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion [55] wurde in einem intestinalen Ischämie/Reperusionsmodell der Katze mit einer Dosierung von 25mg/kg Körpergewicht (KG) [55] erreicht. Eine Dosierung von 25 mg/l ist in einem Modell des hämoperfundierte Lämmerherzen [91] benutzt worden, hier konnte unter Fucoidin eine verbesserte postischämische Funktion erreicht werden. Eine Konzentration von 360mg/l wurde vorab in einem Ischämie-/Reperusions-Modell unter Verwendung einer isoliert hämoperfundierte Rattenleber als wirksam die Organfunktion verbessernd, beschrieben [33]. Wir entschieden uns für eine Dosierung von 100 mg/l.

### **3.2 Organ- und Blutgewinnung am Schlachthof**

Ein 80 bis 120 kg schweres Schwein (Deutsche Landrasse) wurde entsprechend den in Eberswalde verwendeten Methoden geschlachtet. Nach einem betäubenden Elektroschock wurde das Tier an den Hinterläufen aufgehängt und durch Stich in die Karotiden ausgeblutet. Das Stichblut wurde in einer Schale aufgefangen, mit Natriumcitrat und Heparin antikoaguliert, mit 5 mg Verapamil/500 ml Blut versetzt und über einen Glastrichter in Kunststoffflaschen gefüllt.

Nach Brühen des Schweines, Eröffnung des Abdomens, sowie Entfernung der Baueingeweide, lagen die Nieren zur Präparation frei. Die Ureteren wurden im mittleren Drittel durchtrennt sowie die Fett- und fibröse Organkapsel entfernt. Nach stumpfer Mobilisation von Aorta abdominalis und Vena cava inferior wurden diese kranial und kaudal der Abgänge der Nierengefäße durchtrennt und die Nieren exenteriert.

Die Nieren wurden gewogen und arteriell kanüliert. Eine „Heidelberger Verlängerung“ wurde mit Seidenfaden (Vicryl, 4-metric ohne Nadel, 6x75/5x70 Ethicon, Norderstedt, BRD) in die Nierenarterie eingebunden. Anschließend wurde die Niere bei einem Druck von ca. 180 cm Wassersäule mit 500 ml einer auf ca. 4 Grad Celsius gekühlten Konservierungslösung perfundiert.

Danach erfolgte die Lagerung der Nieren auf Eis in mit Konservierungslösung gefüllten Kunststoffbeuteln. Die Konservierungslösung, sowie das Kühlen auf Eis, schützt die ischämieempfindlichen Tubuluszellen über eine Blockade der ionenabhängigen Transportvorgänge und über eine temperaturabhängige Drosselung der Stoffwechselvorgänge [96].

1. – 3. min	Betäubung und Entblutung
4. – 6. min	Organentnahme
7. – 15. min	Präparation, Wiegen, Kanülierung, NaCl + 1000 I.E. Heparin
16. – 30. min	Infusion Konservierungslösung bei 4°C
7 h	Lagerung
1. – 5. min	Perfusion mit 20°C warmer Konservierungslösung
6. min	Beginn normotherme autologe Hämoperfusion der Niere
6. – 45 min	Anlaufphase
45. – 135 min	Messzeitraum, Blut- und Urinanalyse nach 60, 75, 90, 135 min

Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf Schlachthofnieren

### 3.3 Organ- und Blutgewinnung im OP

Die Tiere wurden durch präoperative, intramuskuläre Gabe von Azaperon (200 mg/kg KG) sediert und es wurde Atropin (0,0025 mg/kg KG), ebenfalls intramuskulär, gegeben. Zur Anästhesie erhielten die Tiere Metomidat i.v. (10 mg/kg/KG/h), Fentanyl (0,01 mg/kg/KG/h), (beide Hexal, BRD), sowie eine Einzeldosis Pancuronium (Schwabe-Curamed, BRD) von 0,1-0,2 mg/kg/KG.

Anschließend erfolgte die Intubation und Beatmung der Tiere. Die Tiefe der Narkose wurde über Herzfrequenz und arteriellen Blutdruck kontrolliert. Die Beatmung erfolgte maschinell mit einem 40%igem Luft-/Sauerstoffgemisch. Das Atemvolumen schwankte zwischen 120 und 150 ml/kg KG, die Atemfrequenz betrug 10-14/min.

Es wurde eine systemische Heparinisierung (250 U/kg/KG) durchgeführt. Nach medianem Bauchschnitt wurden die Nieren dargestellt, freipräpariert und entnommen. 500 ml Blut wurde nach Kanülierung aus einem Jugulariszugang gewonnen, in vorbereiteten Transfusionssystemen (Biopack-Compoflex, Biotrans, Dreieich, BRD)

gesammelt und mit 10.000 I.E. Heparin sowie 2 ml Verapamil versetzt. Anschließend wurden Arterie, Vene und Ureter der explantierten Nieren kanüliert und die Reperfusion erfolgte.

1. – 3. Min	Anästhesie
4. – 10. Min	Organentnahme
10. – 20. Min	Präparation, Wiegen, Kanülierung
0. min	Beginn normotherme autologe Hämoperfusion der Niere
0. – 45 min	Anlaufphase
45. – 135 min	Messzeitraum, Blut- und Urinanalyse nach 60, 75, 90, 135 min

Tabelle 4: Zeitlicher Ablauf OP-Nieren

### 3.4 Versuchsaufbau

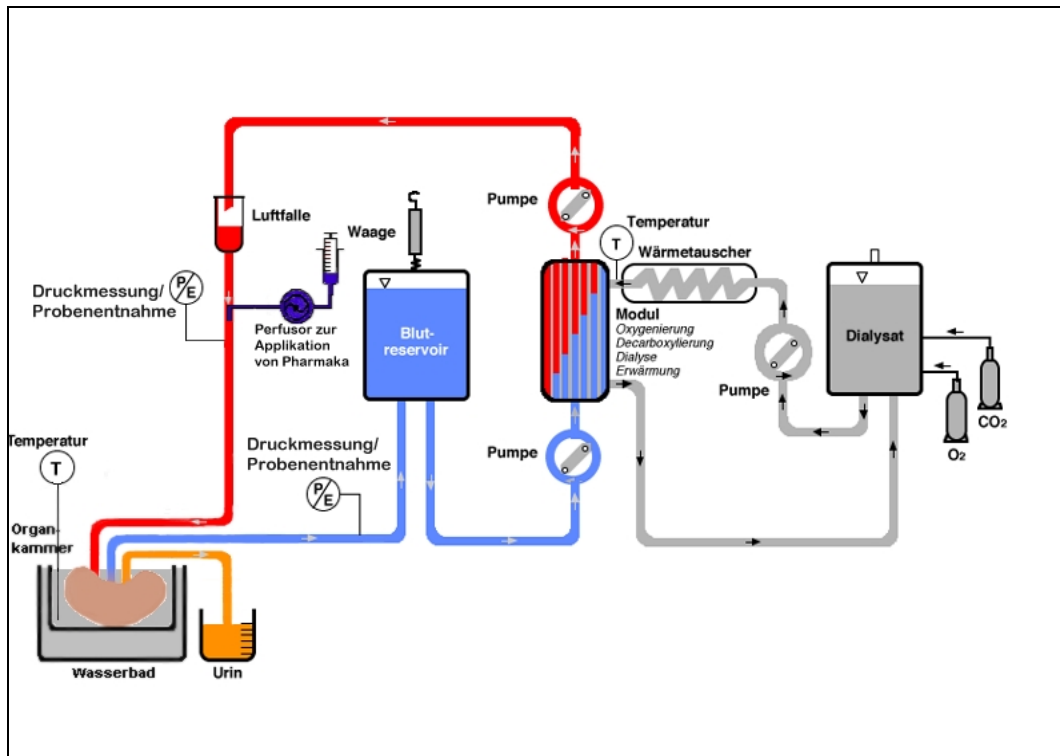
Der Versuchsaufbau bestand aus zwei Kreisläufen, die über ein Dialysem modul (Kapillardialysator Polysulfone UF 6.4 Hemoflow F7, Fresenius AG, Bad Homburg) miteinander in Verbindung standen. Im Dialysem modul flossen Blut und Dialysat, getrennt durch eine semipermeable Membran, im Gegenstromprinzip aneinander vorbei. Dabei wurde das Blut oxygeniert, decarboxyliert, erwärmt, und es fand ein Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Dialysat statt, so dass dadurch Blutvolumen und Hämatokrit reguliert werden konnten. Im Blutkreislauf beförderte eine Rollerpumpe (Multiflow, Typ 10 00 00 (Dyalisat), Typ 10 20 00 (Blut), Stöckert Instrumente, München, BRD) das aus dem Modul kommende arterialisierte Blut über eine Luftfalle in die Arteria renalis. Zwischen Luftfalle und Niere befand sich eine Entnahme- und Druckmessstelle für die regelmäßige Abnahme arterieller Blutproben und zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Blutdrucks. Ein Temperatursensor (5F Swan-Ganz Thermodilution 0.5cc CAP, 93-132-5F) maß hier gleichzeitig die Bluttemperatur vor der Niere.



Die Niere lag in einer offenen Organkammer, welche sich ihrerseits in einem auf 38°C erhitzten Wasserbad befand. Die Temperatur der Niere wurde kontinuierlich mit einer in der Organkammer liegenden Messsonde überwacht und konstant gehalten. Der während der Perfusion gebildete Urin wurde in einem Messzylinder gesammelt und das Urinvolumen regelmäßig kontrolliert. Das renalvenöse Blut floss über einen in die Vena renalis eingelegten Katheter in ein venöses Blutreservoir zurück. Als Blutreservoir diente ein Blutbeutel, dessen Gewicht kontinuierlich durch eine Hängewaage angezeigt wurde. Dadurch konnten Änderungen des Blutvolumens überwacht werden. Eine zweite Pumpe leitete das Blut wieder in das Dialysem modul zurück.

Um den Hämatokrit einzustellen und die produzierte Urinmenge ersetzen zu können, musste Flüssigkeit aus dem Dialysekreislauf über das Dialysem modul dem Blutkreislauf zugeführt oder entzogen werden. Dies wurde durch die Änderung des Verhältnisses der Förderleistungen der renalvenösen Pumpe und der das Dialysat fördernden Pumpe erreicht. Dabei wurde ausschließlich der Blutfluss der zweiten Pumpe verändert, damit es direkt an der Niere nicht zu Perfusionsflussänderungen kam.

Das Perfusionsmedium bestand aus 500 ml Eigenblut der Schweine. Im Dialysatkreislauf wurde das Dialysat mit einem Fluss von 1,5 l/min durch eine Rollerpumpe aus einem skalierten Behälter in einen auf 39°C eingestellten Wärmetauscher geleitet. Von dort floss es durch das Dialysem modul zurück in den Dialysatbehälter. In das Dialysat wurde mittels Sprudelstein ein Gasgemisch mit 500 ml/min Sauerstoff und 36 ml/min Kohlendioxyd eingeleitet. Durch Veränderung des Kohlendioxidangebotes im Dialysat konnte der pH-Wert des Blutes reguliert werden.



Das Dialysemodul befindet sich in Bildmitte, hier flossen Blut und Dialysat im Gegenstromprinzip aneinander vorbei. Dabei fanden Oxygenierung, Decarboxylierung, Dialyse, Erwärmung und Flüssigkeitsaustausch statt. Das arterialisierte Blut wurde über eine Luftfalle zur Niere, die sich in einer Organkammer in einem 37°C warmen Wasserbad befand, geleitet. Der Urin wurde in einem darunter stehendem Sammelgefäß aufgefangen. Das renalvenöse Blut gelangte in das Blutreservoir, dessen Gewicht, kontrolliert durch eine Hängewaage, mittels zweier Rollerpumpen konstant gehalten wurde. Arterielle und venöse Blutentnahmestellen wurden gleichzeitig zur kontinuierlichen Druckmessung genutzt.

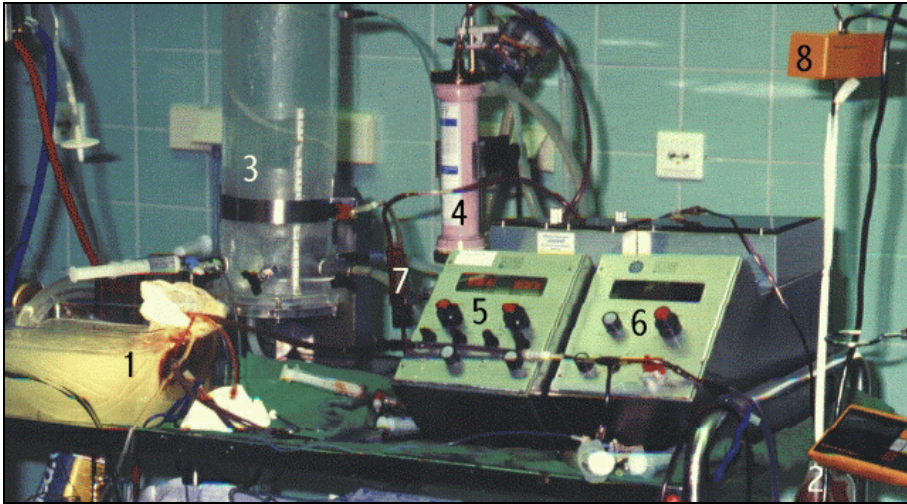


Abbildung 5: Perfusionsaufbau

1 – Organkammer im Wasserbad, 2 – Blutreservoir, 3 – Dialysatbehälter, 4 – Dialysemodul „F7“, 5 – zwei Pumpen für Blutkreislauf, 6 – Pumpe Dialysatkreislauf, 7 – Luftfalle, 8 – Hängewaage

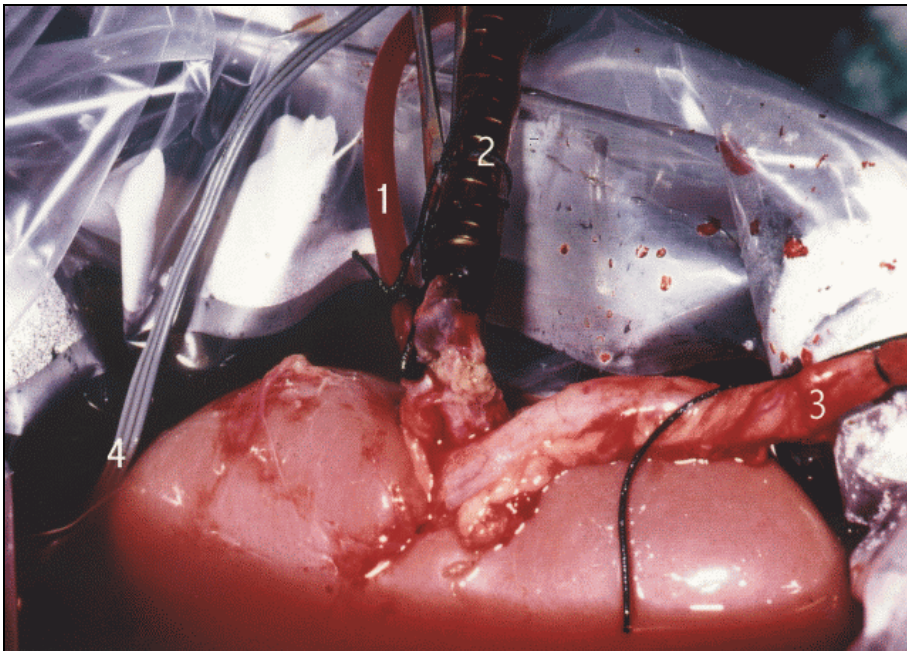


Abbildung 6: Die Niere während der Reperfusion

1: Arterieller Zufluss, 2: Venöser Rückfluss, 3: Ureter, 4: Temperatursonde

### 3.5 Versuchsaufbau

Der Aufbau erfolgte gemäss dem Abbildungsschema 4. Die Messsonden wurden angeschlossen. 3 Liter Dialysat wurden in den Dialysatbehälter gefüllt und begast. Anschließend erfolgte ein Vorlauf des Systems mit 500 ml heparinisierter (10000 IE) Kochsalzlösung, um das Dialysat bei aktiviertem Kreislauf zu erwärmen. Nach Erwärmung des Dialysates erfolgte der Anschluss des Blutreservoirs (500 ml) und der Perfusionskreislauf wurde geschlossen. Dann wurden die Pumpen in Betrieb genommen. Das Blut wurde durch 20minütiges Vorbeiführen an der warmen Dialysatlösung auf 37°C erwärmt. Danach erfolgte der Beginn der Organperfusion mit einem initialen Blutfluss von 20 ml/min und einem kontinuierlichen Perfusionsdruck von 80 mmHg. Nach Erreichen einer vollständigen Organerwärmung (45 min) wurden in 15 minütigen Abständen Blutproben (nach 60, 75, 90, 105 Min.) entnommen und das Urinvolumen bestimmt. Vor Reperfusionbeginn wurde dem Blut der Versuchsgruppen 100mg/l Fucoidin zugesetzt. Die Kontrollnieren erhielten die gleiche Flüssigkeitsmenge an verwendetem Lösungsmittel (Aqua dest.).

Gemessen wurden folgende Parameter:

Parameter	Einheit
Nierengewicht nativ	g
Versuchsdauer	min
Perfusionsfluss	$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$
Arterieller Druck	mmHg
Venöser Druck	mmHg
Temperatur	°C
Urinvolumen	ml
Hämoglobingehalt	g/dl
Hämatokrit	%
Sauerstoffsättigung arteriell und venös	%

Tabelle 5: Gemessene Parameter (a)

Parameter	Einheit
Sauerstoffpartialdruck arteriell und venös	mmHg
Kohlendioxidpartialdruck arteriell und venös	mmHg
pH-Wert	p [H <sup>+</sup> ]
Bicarbonatkonzentration arteriell und venös	mmol/l
Natriumkonzentration in Plasma und Urin	mmol/l
Kreatininkonzentration in Plasma und Urin	mg/dl
Dauer der warmen Ischämie	min
Dauer der Kryokonservierung	min

Tabelle 6: Gemessene Parameter (b)

Berechnet wurden daraus:

Parameter	Formel	Einheit
Diurese	$U = VU / t / NG * 100$	$ml * min^{-1} * 100g^{-1}$
Vaskulärer Widerstand	$R = (P_{art} - P_{ven}) / RBF$	$mmHg * ml^{-1} * min^{-1} * 100g^{-1}$
Renaler Plasmafluss	$RPF = RBF * (1 - Hkt)$	$ml * min^{-1} * 100g^{-1}$
Art./ven. O <sub>2</sub> -Gehalt	$CxO_2 = 1.34 * Hb * SxO_2 + 0.003 * PxO_2$	$ml * dl^{-1}$
Sauerstoffangebot	$O_2D = RBF * CaO_2 / 100$	$ml * min^{-1} * 100g^{-1}$
Sauerstoffverbrauch	$O_2 cons = (CaO_2 - CvO_2) / 100 * RBF$	$ml * min^{-1} * 100g^{-1}$
Natriumtransport	$TNa = [(NaPI * CC) - (NaU * U)] / 1000$	$mmol * min^{-1} * 100g^{-1}$
Kreatinin-Clearance	$CC = (KreaU / KreaPI) * U$	$ml * min^{-1} * 100g^{-1}$
Filtrationsfraktion	$FF = RPF / CC$	%

Tabelle 7: Berechnete Parameter und Formeln.

Die Werte beziehen sich jeweils auf 100 g natives Nierengewicht. Das verwendete Dialysat wurde nach Rezepturen von v. Baeyer [96] hergestellt. Das Dialysat soll eine möglichst physiologische Zusammensetzung der Elektrolyte, des Säure-Basen-Verhältnisses, sowie der Blutgase im Perfusionsmedium bewirken.

Substanz	Konzentration
NaCl	110 mmol/l
KCl	4 mmol/l
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mmol/l
MgCl <sub>2</sub>	1 mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	25 mmol/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 mmol/l
Glucose	144 mg/dl
Harnstoff	30 mg/dl
Kreatinin	5.7 mg/dl

Tabelle 8: Dialysatlösung (modifizierte Tyrodelösung)

Substanz	Konzentration
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	75 mmol/l
NaCl	10 mmol/l
MgSO <sub>4</sub>	10 mmol/l
Saccharose	40 mmol/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	3 mmol/l
PEG 4000 = Polyethylen-glycol	10 %

Tabelle 9: Zusammensetzung der Konservierungslösung

### **3.6 Blutviskositätsmessung**

Die Blutviskosität wurde mittels eines Kegelplatten-Viskosimeters, wie vorab beschrieben, gemessen [100]. Es fand sich kein Unterschied in der Viskosität zwischen dem Kontrollblut und dem Blut der Fucoidingruppen (3.86 vs. 3.65 Centipoise, gemessen bei einer Scherrate von  $225\text{ s}^{-1}$ ,  $p>0.1$ ).

### **3.7 Faktor Xa-Aktivitätstest**

Der Plasma-Heparinspiegel wurde mit dem Faktor Xa-Aktivitätstest [101] bestimmt und lag bei beiden Gruppen unter 20 U/ml.

## **3.8 Histologische Methoden**

### **3.8.1 Gewebeasservierung**

Nach Versuchsende wurden drei maximal 5 mm dicke Gewebescheiben unter Miterfassung von Rinde, Mark sowie Nierenbecken entnommen und in 5 %igem, gepuffertem Formaldehyd (Herbeta, BRD) mindestens 12 Stunden fixiert.

### **3.8.2 Konventionelle Färbungen**

Die Gewebeproben wurden nach Paraffineinbettung in Stufenserienschnitten aufgearbeitet. Die Färbung der Präparate erfolgte standardmäßig mit Hämalaun-Eosin (HE), nach Masson-Goldner (MG) und per Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) [102]. Die HE-Färbung dient dabei als eine einfache und schnelle Übersichtsfärbung der Schnittpräparate. Die PAS-Färbung dient der Darstellung neutraler Mukopolysaccharide, Polysaccharide, Muko- und Glykoproteine, Glykolipide, ungesättigter Fette und Phospholipide. Mittels MG-Färbung lassen sich Kollagenfibrillen erkennen und Epithelien bzw. Muskelfasern differenzieren [102].

### **3.8.3 Immunhistologische Färbungen**

#### **3.8.3.1 CD45**

Mittels APAAP- (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) Methode wurden die CD45-positiven Leukozyten in den Gewebsschnitten farblich markiert. Verwendet wurde dafür ein allotypischer Mouse anti Porcine CD45-Antikörper (MCA 1447, Clone Nr. MAC 323, Serotec Ltd. Oxford England) [103]. Dieser Antikörper erkennt spezifisch porcine CD45 der „Grossen Weißen“ und der „Deutschen Landrasse“. Schweine der „Deutschen Landrasse“ wurden auch in unseren Experimenten verwendet. Der Antikörper kann an Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Material verwendet werden. Kreuzreaktionen sind nicht bekannt. Der Antikörper wurde nach Austestung in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Die APAAP-Methode wurde entsprechend der (modifizierten) Anleitung „APAAP-Färbemethode“ der Firma DAKO Diagnostika GmbH Hamburg durchgeführt. Um das Färbeergebnis zu optimieren, wurde eine Antigendemaskierung mittels 2minütigem Kochen im Dampftopf durchgeführt. Die farbliche Markierung erfolgte mit Fast red (rot) (Dako, Code K 0597).

#### **3.8.3.2 Fibrinogen**

Porcines Fibrinogen wurde dargestellt mittels immunhistochemischer Markierung durch den kreuzreaktiven Antikörper Rabbit anti-human fibrinogen (DAKO, A0080 Lot 097). Dieser Antikörper reagiert mit nativem, humanem Fibrinogen, sowie mit den Fibrinogenfragmenten D und E [104]. Auch hier wurde die modifizierte APAAP-Methode, wie oben beschrieben, verwendet. Gewählt wurde die Fibrinogendarstellung, um Fibrinausfällungen und damit indirekt aktivierte Thrombozyten nachzuweisen [105], da Fibrinogen eine wichtige Rolle bei der Plättchenaggregation spielt [106].



### 3.8.4 Histologische Auswertung

Nach Abschluss aller Versuche wurden die angefertigten Schnittpräparate geblindet sowie mikroskopisch (Mikroskop Leitz DMRB) begutachtet und ausgewertet.

#### 3.8.4.1 Granulozytenzählung

Die neutrophilen Granulozyten, welche eine typische Morphologie sowie eine gut detektierbare zytoplasmatische PAS-Positivität aufweisen, wurden in 10 HPF/Präparat (HPF: High power field, entsprechend einem Gesichtsfeld in 400facher Vergrößerung) ausgezählt.

Differenziert wurde in:

Anzahl der ausschließlich innerhalb des intraglomerulären Schlingenkonvolutes gelegenen neutrophilen Granulozyten (n/10 HPF)
Anzahl der ausschließlich innerhalb des peritubulären kapillaren Netzwerk gelegenen neutrophilen Granulozyten (n/10 HPF)
Anzahl der ausschließlich intraparenchymatös (extrakapillar) gelegenen neutrophilen Granulozyten (n/10 HPF)
Gesamtzahl aller neutrophilen Granulozyten

Tabelle 10: Auswertungsparameter für neutrophile Granulozyten

### 3.8.4.2 CD45-positive Leukozyten

Die mittels immunhistologischer Methoden (APAAP-Technik) rot markierten CD45-positiven Leukozyten wurden analog den neutrophilen Granulozyten in 10 HPF/Präparat ausgezählt.

Differenziert wurde in:

Anzahl der ausschließlich innerhalb des intraglomerulären Schlingenkonvolutes gelegenen CD45-positiven Leukozyten(n/10 HPF)
Anzahl der ausschließlich innerhalb des peritubulären kapillären Netzwerk gelegenen CD45-positiven Leukozyten (n/10 HPF)
Anzahl der ausschließlich intraparenchymatös (extrakapillär) gelegenen CD45-positiven Leukozyten (n/10 HPF)
Gesamtzahl aller CD-45-positiven Leukozyten (n/10 HPF)

Tabelle 11: Auswertungsparameter für CD45-positive Leukozyten

### 3.8.4.3 Fibrinogen

Das Ausmaß intravasculärer Fibrinogenausfällungen wurde semiquantitativ eingeschätzt. Dafür wurden die Fibrinogenausfällungen in den Vasa afferentia und in den glomerulären Arteriolen ausgezählt. Ausgewertet wurden mindestens 10 HPF bzw. Glomeruli/Präparat.

Anzahl intravasaler (Vasa afferentia) Fibrinogenausfällungen pro 10 HPF
Anzahl intraglomerulärer Fibrinogenausfällungen pro 10 Glomeruli
Anzahl peritubulärer (intravasaler) Fibrinogenausfällungen pro 10 HPF

Tabelle 12: Fibrinogendarstellung

#### **3.8.4.4 Mikroembolien**

Während der histologischen Auswertung wurden unerwartet zusätzlich intravaskuläre Mikroembolien innerhalb der präglomerulären Arteriolen beobachtet. Diese wurden ebenfalls ausgezählt und in n/10 Vasa afferentia/Präparat angegeben.

### **3.9 Statistische Berechnungen**

Alle Berechnungen des Mittelwertes (MW), des Standardfehlers (SD), Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) sowie der verwendete U-Test für ungleiche Varianzen (Mann-Whitney-Test) wurden mittels des statistical package of social sciences (SPSS), Version 8.0 (SPSS Inc., USA) durchgeführt.

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einem Wert von  $p < 0,05$  angenommen. Abweichend davon wurde für den Parameter intravaskuläre Mikroembolien der Fisher exakt Test verwendet. Auch hier wurde bei einem Wert von  $p < 0,05$  ein statistisch signifikanter Unterschied angenommen.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Klinische Parameter**

#### **4.1.1 Ischämiezeiten und Gewicht**

Fucoidin- und Kontrollnieren unterscheiden sich nicht bezüglich Zeit der kurzen oder langen Ischämie oder dem nativen Gewicht. Die Dauer der warmen Ischämie betrug in der Kontrollgruppe  $17 \pm 6,7$  Minuten (MW  $\pm$  SD), die Zeit der Kältekonserverung betrug  $6,7 \pm 1,9$  Stunden (MW  $\pm$  SD).

In der Versuchsgruppe betrug die warme Ischämie  $18,7 \pm 6,2$  Minuten (MW  $\pm$  SD), die Kältekonserverung dauerte  $7,1 \pm 1,5$  Stunden (MW  $\pm$  SD)

#### **4.1.2 Vaskulärer Widerstand, Blutfluss, Sauerstoffverbrauch**

Fucoidinnieren zeigen sowohl nach kurzer als auch langer Ischämie einen erhöhten vaskulären Widerstand, einen verminderten renalen Blutfluss und einen verminderten Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu den Kontrollnieren.

Eine Reduktion der Kreatinin-Clearance sowie des renalen Natriumtransportes wurde nur nach kurzer, nicht aber nach langer Ischämie beobachtet.

Parameter/Gruppe	Kurze Ischämie		P	Lange Ischämie		P
	Kontrolle n=7	Fucoidin n=6		Kontrolle n=5	Fucoidin n=6	
MAD (mmHg)	80,85 ± 10,8	106,67 ± 34,6	0,01	89,54 ± 20,4	89,17 ± 12,2	n.s.
Perfusionsfluss (ml/min/100g)	177,9 ± 115,8	44,60 ± 22,9	0,01	101,94 ± 44,7	66,21 ± 29,8	0,01
Renaler Plasmafluss (ml/min/100g)	135,35 ± 18,90	64,46 ± 16,88	0,01	77,80 ± 7,42	49,98 ± 4,97	0,01
Na-Clearance	7,35 ± 4,3	3,68 ± 3,0	0,01	3,22 ± 4,6	5,21 ± 5,0	0,05
Ena (mmol/ml)	1,03 ± 0,6	0,51 ± 0,41	0,01	0,45 ± 0,65	0,7 ± 0,67	0,01
Lna (mmol/ml)	3,25 ± 1,7	1,39 ± 1,0	0,01	2,29 ± 2,2	2,04 ± 1,8	0,01
Tna (mmol/min/100g)	2,59 ± 1,5	0,58 ± 0,46	0,01	0,97 ± 1,1	0,65 ± 0,68	n.s.

Tabelle 13: Klinische Parameter (a)

Parameter/Gruppe	Kurze Ischämie		P	Lange Ischämie		P
	Kontrolle n=7	Fucoidin n=6		Kontrolle n=5	Fucoidin n=6	
RFNa (%)	96,61 ± 1,0	95,88 ± 4,0	n.s.	84,01 ± 24,8	96,89 ± 1,8	0,01
O <sub>2</sub> -Verbrauch (mmol/min/100g)	0,2 ± 0,2	0,08 ± 0,06	0,01	0,11 ± 0,13	0,12,04	0,05
Widerstand	0,60 ± 0,3	3,80 ± 3,3	0,01	1,64 ± 2,0	1,99 ± 1,8	0,05
FF (GFR/RPF) (%)	0,23 ± 0,1	0,42 ± 0,4	n.s.	0,17 ± 0,2	0,12 ± 0,1	n.s.
Urinmenge (ml/min/100g)	9,70 ± 5,4	4,80 ± 3,7	0,01	1,90 ± 2,3	3,46 ± 3,2	n.s.
Urin-Kreatinin (mg/dl)	14,55 ± 7,2	16,98 ± 14,2	n.s.	23,53 ± 25,4	7,64 ± 3,1	0,01
Plasma-Kreatinin (mg/dl)	4,99 ± 1,3	5,37 ± 1,7	n.s.	3,89 ± 0,9	3,57 ± 0,8	n.s.
GFR (ml/min/100g)	26,90 ± 14,3	11,01 ± 8,6	0,01	11,80 ± 18,5	7,33 ± 7,0	n.s.

Tabelle 14: Klinische Parameter (b)

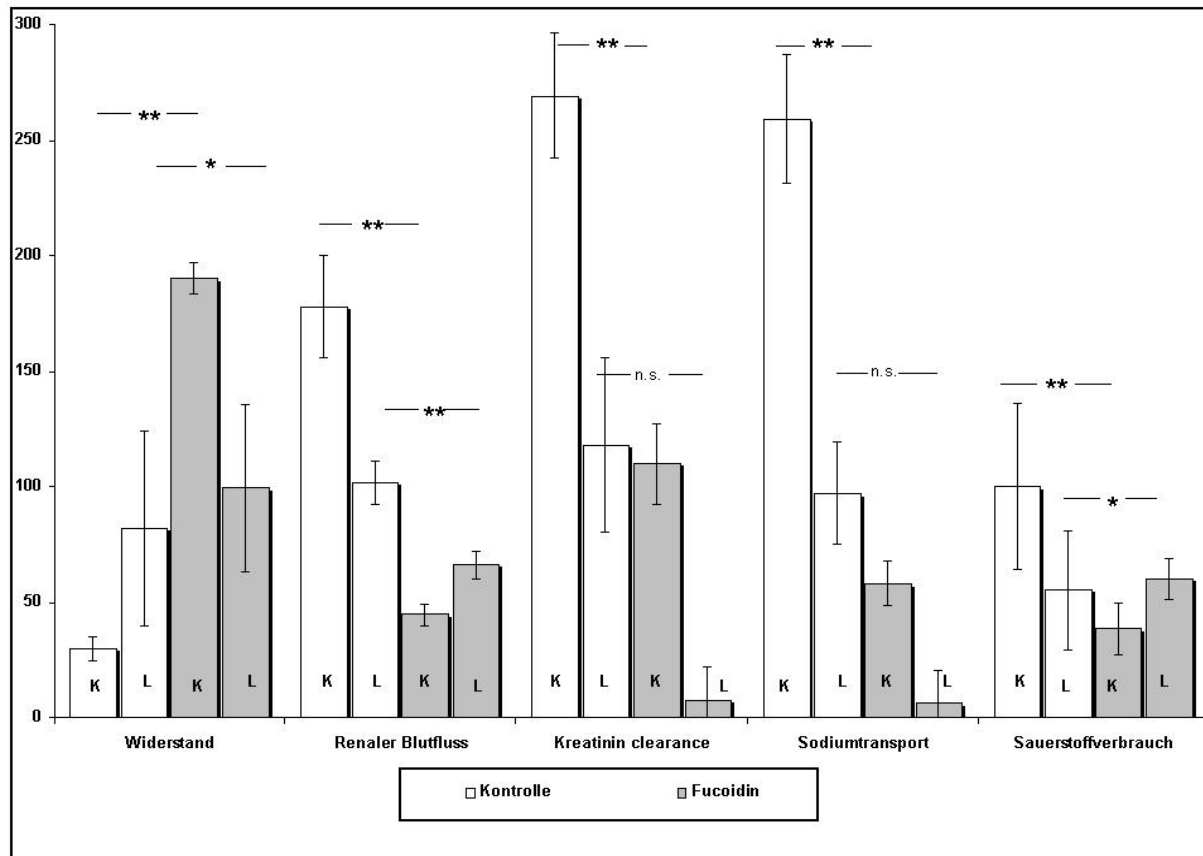


Abbildung 7 Klinische Parameter: vaskulärer Widerstand, renaler Blutfluss, Kreatinin-Clearance, Natriumtransport und Sauerstoffverbrauch.

Die Nieren wurden in Gruppen mit kurzer (K) und langer (L) Ischämie eingeteilt. Die Perfusion erfolgte mit oder ohne Zugabe von 100mg/l Fucoidin. Vaskulärer Widerstand  $50 \times [\text{mmHg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}]$ , renaler Blutfluss  $[\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}]$ , Kreatinin-Clearance  $10 \times [\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}]$ , Natriumtransport  $100 \times [\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}]$  und Sauerstoffverbrauch  $1000 \times [\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}]$  wurden in regelmäßigen Blut- und Urinproben bestimmt. Die Angaben erfolgten als  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ . \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

## 4.2 Renale Histologie

### 4.2.1.1 Neutrophile Granulozyten

In beiden Fucoidingruppen, sowohl nach kurzer und langer Ischämie, zeigt sich eine signifikant höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten gegenüber den Kontrollgruppen in den Kategorien: Gesamtzahl Granulozyten, intraglomeruläre Granulozyten und peritubuläre Granulozyten. Die Anzahl an intraparenchymatösen Granulozyten war nur nach kurzer Ischämie in der Fucoidingruppe gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht, in der Gruppe der Nieren nach langer Ischämie bestand kein Unterschied.

Parameter/Gruppe	Kurze Ischämie		P	Lange Ischämie		P
	Kontrolle n=7	Fucoidin n=6		Kontrolle n=5	Fucoidin n=6	
Intraglomeruläre PMN (n/HPF)	2,81 ± 1,84	3,92 ± 2,21	0,012	5,9 ± 2,01	7,42 ± 2,38	0,001
Peritubuläre PMN (n/HPF)	6,30 ± 3,11	7,88 ± 2,93	0,001	8,32 ± 2,71	11,43 ± 4,00	0,001
Intraparenchymatöse PMN (n/HPF)	1,80 ± 1,08	2,38 ± 0,90	0,001	3,0 ± 1,24	2,93 ± 1,13	n.s.
Total PMN (n/HPF)	10,91 ± 5,24	14,18 ± 3,06	0,001	17,22 ± 2,57	21,78 ± 4,56	0,001

Tabelle 15: Granulozytenzählung

Granulozytenzählung PMN: polymorphkernige neutrophile Granulozyten. Angaben als MW ± SD



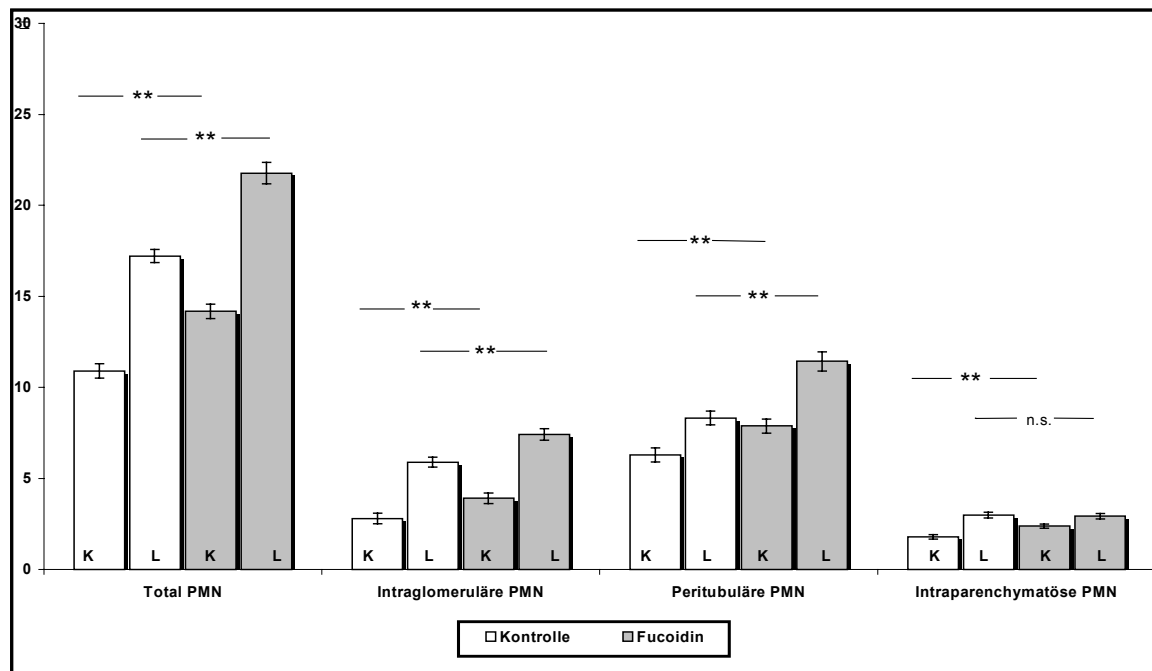


Abbildung 8: Diagramm Granulozytenzählung

Es wurden zwei Gruppen mit kurzer (K) und langer (L) Ischämie gebildet. Ausgezählt wurden 10 HPF (HPF = Gesichtsfeld in 400x Vergrößerung) pro Präparat. Die intraglomerulären Granulozyten wurden pro 10 Glomeruli ausgezählt. PMN: polymorphkernige neutrophile Granulozyten. Angaben als MW  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

#### 4.2.1.2 CD45-positive Leukozyten

In beiden Fucoidingruppen, sowohl nach kurzer als auch nach langer Ischämie, zeigt sich gegenüber den Kontrollgruppen eine höhere Anzahl CD45-positiver Leukozyten bei den Parametern: intraglomeruläre, peritubuläre, intraparenchymatöse und Gesamtzahl CD45-positive Leukozyten.

Parameter/Gruppe	Kurze Ischämie		P	Lange Ischämie		P
	Kontrolle n=7	Fucoidin n=6		Kontrolle n=5	Fucoidin n=6	
Intraglomeruläre CD45pL (n/HPF)	5,8 ± 1,27	8,17 ± 4,35	0,021	5,63 ± 2,50	12,50 ± 5,55	0,000
Peritubuläre CD45pL (n/HPF)	22,6 ± 2,19	30,73 ± 10,27	0,018	19,90 ± 8,16	30,03 ± 9,56	0,000
Intraparenchymatöse CD45pL (n/HPF)	2,43 ± 0,57	3,23 ± 1,17	0,001	2,27 ± 1,31	2,68 ± 0,97	0,042
Total CD45pL (n/HPF)	30,83 ± 2,93	42,13 ± 14,95	0,023	27,80 ± 8,92	45,20 ± 7,75	0,000

Tabelle 16: CD45-positive Leukozyten (CD45pL). Angaben als MW ± SD.

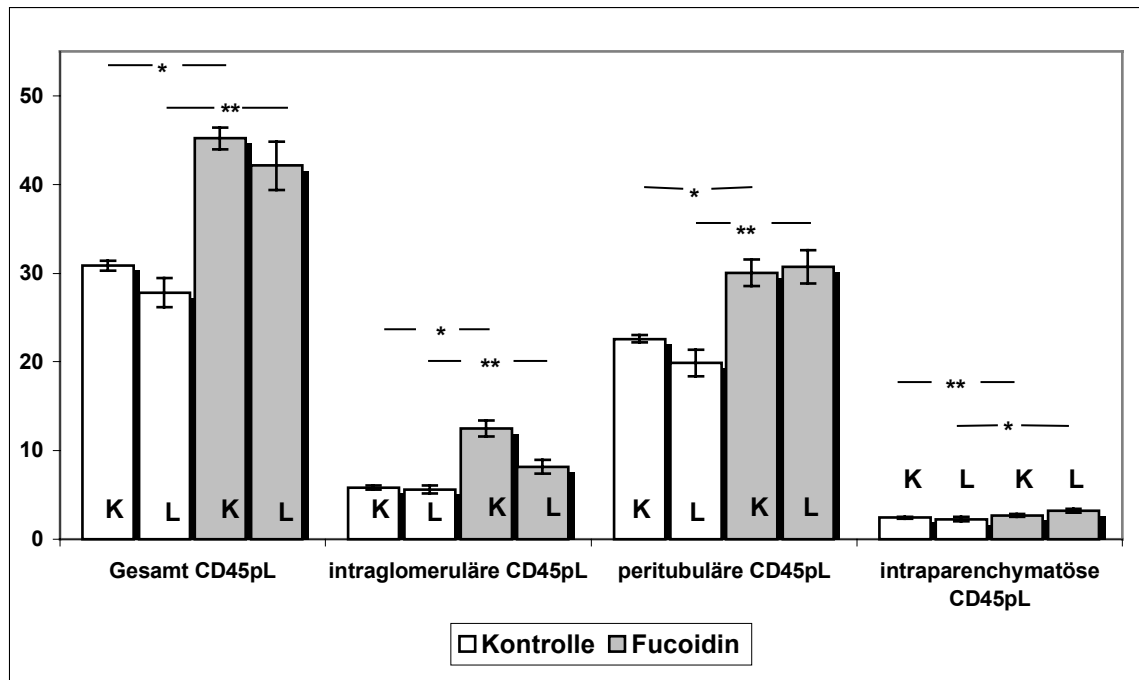


Abbildung 9: CD45-positive Leukozyten

Es wurden zwei Gruppen mit kurzer (K) und langer (L) Ischämie gebildet. Ausgezählt wurden 10 HPF (HPF = Gesichtsfeld in 400x Vergrößerung) pro Präparat. CD45pL: CD45-positive Leukozyten Angaben als MW  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

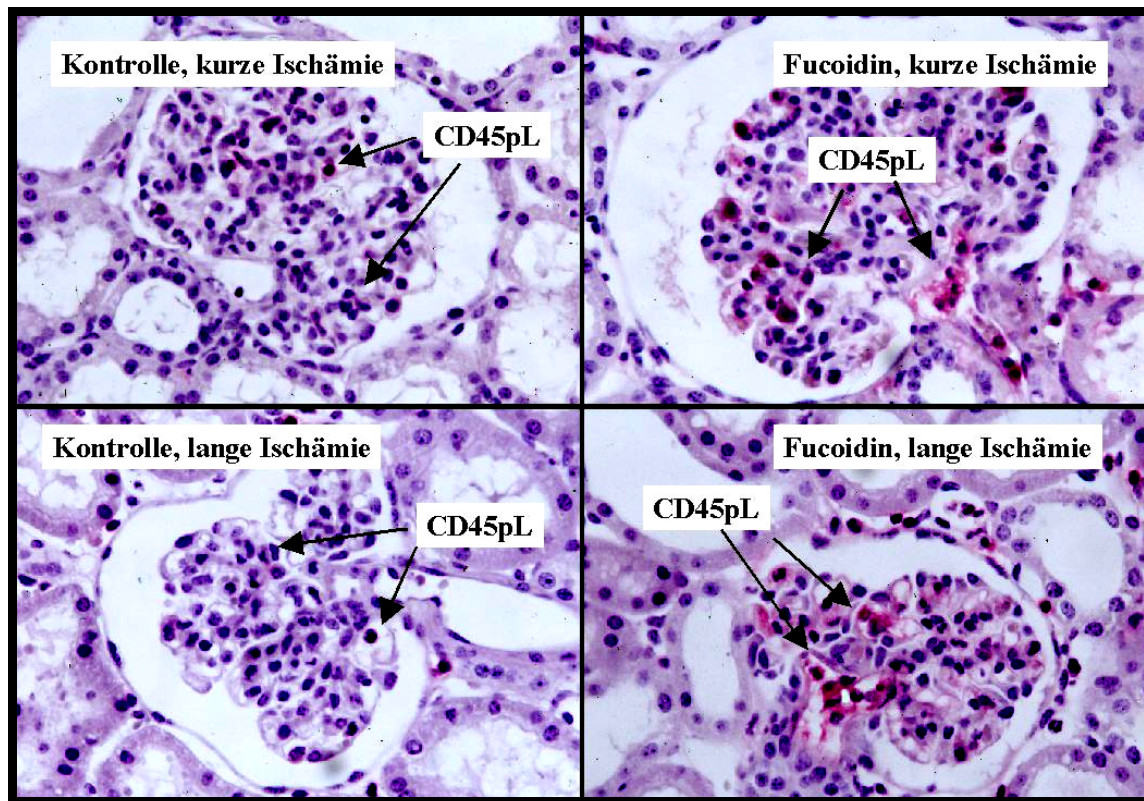


Abbildung 10: CD45-positive Leukozyten in Kontrollen und Fucoidinnieren.

CD45pL: CD45-positive Leukozyten. Dargestellt sind Glomeruli in 400facher Vergrößerung. Die Pfeile markieren exemplarisch immunhistochemisch (APAAP-Technik) markierte, CD45-positive Leukozyten. Die abgebildeten Vasa afferentia der Fucoidinnieren zeigen Aggregate von CD45-positiven Leukozyten. Dabei finden sich auch zahlreiche Granulozyten, zu erkennen an ihrer typischen Morphologie, in diesen Aggregaten.

#### 4.2.1.3 Fibrinogen

In beiden Fucoidingruppen zeigen sich nach kurzer und nach langer Ischämie vermehrt intraglomeruläre Fibrinogenausfällungen im Vergleich zu den Kontrollen ( $1,98 \pm 0,32$  vs.  $9,16 \pm 0,79$ ,  $p < 0,001$  und  $4,73 \pm 0,71$  vs.  $8,35 \pm 1,01$ ,  $p < 0,009$ ). Auch innerhalb der Vasa afferentia fanden sich vermehrt intravasale Fibrinogenausfällungen.

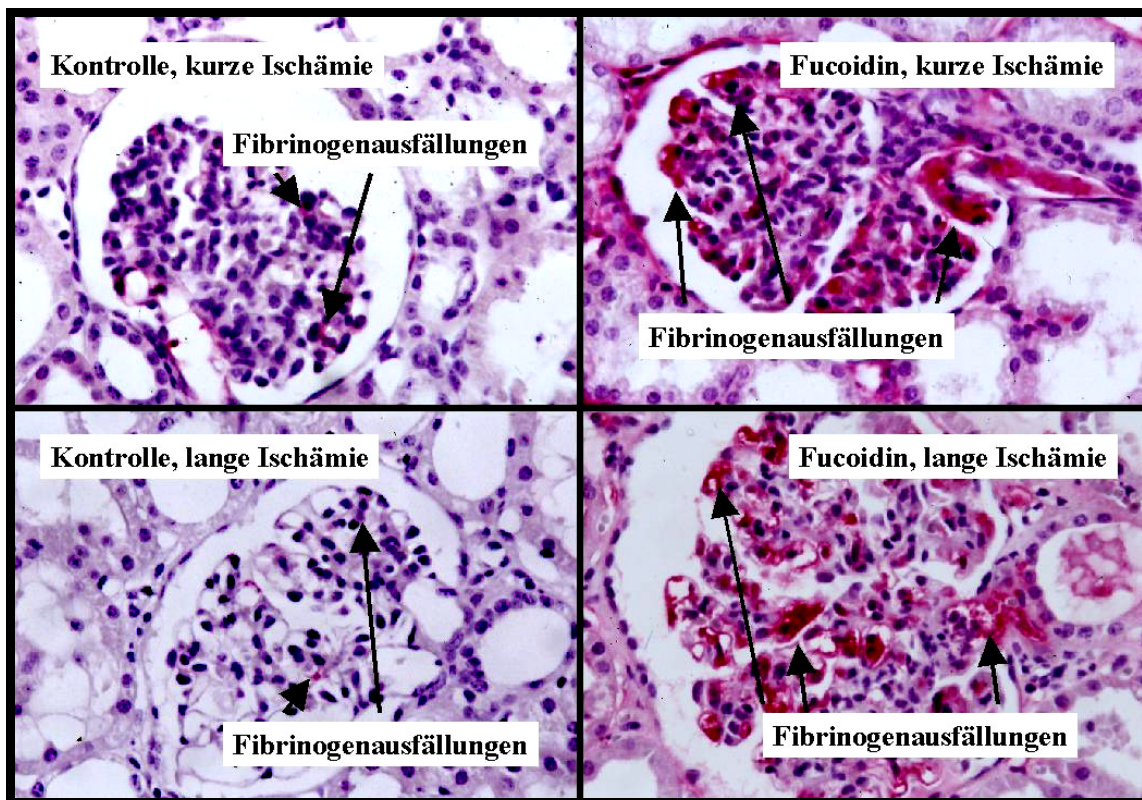


Abbildung 11: Fibrinogen in Kontrollen und Fucoidinnieren. Dargestellt sind Glomerula in 400facher Vergrößerung. Die Pfeile markieren exemplarisch immunhistochemisch markierte (APAAP-Technik), intravasale Fibrinogenausfällungen. In beiden Fucoidinnieren zeigen sich innerhalb der glomerulären Arteriolen vermehrt Fibrinogenausfällungen gegenüber den Kontrollen. Auch die afferenten Arteriolen der Fucoidinnieren zeigen deutliche Fibrinogenausfällungen.

#### 4.2.1.4 Mikroembolien

Intravaskuläre granulozytäre Mikroembolien zeigten sich in 10 von 12 Nieren der Fucoidingruppen und in 2 von 12 Kontrollen. Dabei fanden sich Mikroembolien im Median in 10 (min=5, max=10) von 10 Gesichtsfeldern bei den 10 Mikroembolie-positiven Fucoidinnieren, im Median bei 4,5 (min=2, max=6) von 10 Gesichtsfeldern der 2 Mikroembolie-positiven Kontrollnieren

Parameter/Gruppe	Kurze Ischämie		P	Lange Ischämie		P
	Kontrolle n=7	Fucoidin n=6		Kontrolle n=5	Fucoidin N=6	
PMN-Mikroembolie (Anzahl Nieren gesamt)	1	5	0,001	1	5	0,001
PMN-Mikroembolie (Anzahl/10 HPF)	0,86±2,27 Median:0 min.:0 max.:6	7,67±2,07 Median: 8 min.:4 max.:10	0,002	3,00±3,24 Median:1 min.:0 max.:7	7,17±1,17 Median:7,5 min.:5 max.:8	0,003

Tabelle 17: Mikroembolien. Intravasale granulozytäre Mikroembolien Angaben als MW±SEM, PMN: polymorphkernige neutrophile Granulozyten



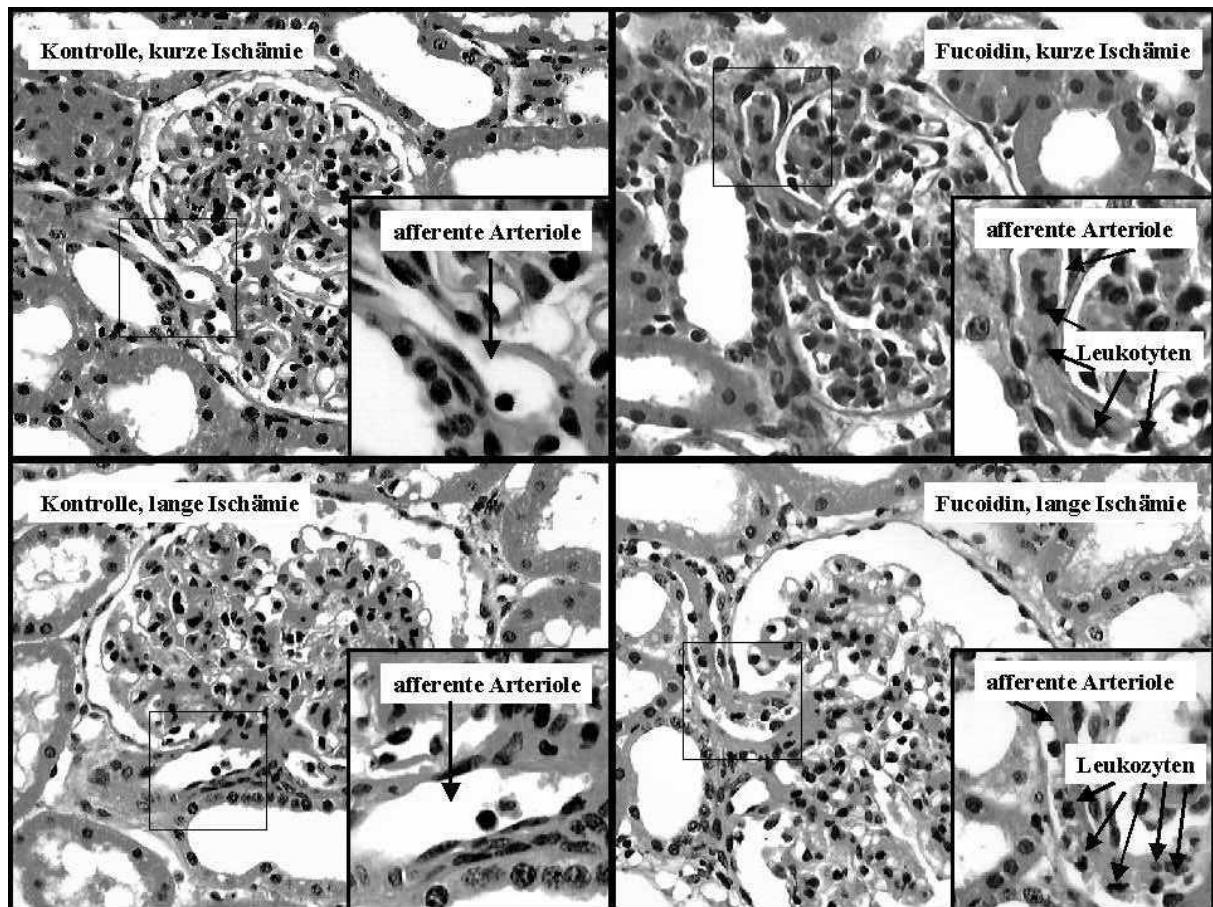


Abbildung 12: Granulozytäre Mikroembolien in Kontrollen und Fucoidinnieren.

Dargestellt sind Glomeruli in 200facher Vergrößerung mit zugehörigen afferenten Arteriolen. Insets: Afferente Arteriolen in 400facher Vergrößerung. In beiden Fucoidinnieren finden sich innerhalb der afferenten Arteriolen leukozytäre Aggregate. Die Zellkerne heben sich schwarz ab. Aus morphologischer Sicht handelt es sich dabei überwiegend um Granulozyten. Innerhalb der afferenten Arteriolen der abgebildeten Kontrollnieren finden sich dagegen keine bzw. nur einzelne Leukozyten.

## 5 Diskussion

Mit dieser Arbeit sollte die Hypothese, dass Fucoidin durch Blockade der Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion einen positiven Effekt auf die Funktion der ex-vivo hämoperfundenen Schweineniere in der frühen Phase nach Reperfusion hat, untersucht werden. Betrachtet wurden dabei funktionelle, hämodynamische und histopathologische Aspekte.

Die durchgeführten Experimente demonstrieren, dass Fucoidin in einer Konzentration von 100mg/l in der isoliert hämoperfundenen Schweineniere einen Anstieg des vaskulären Widerstandes und konsekutiv einen Abfall des renalen Plasmaflusses sowie des renalen Perfusionsflusses verursacht. Ein Abfall des Sauerstoffverbrauchs war ebenfalls zu verzeichnen. Die histologische Begutachtung der Präparate ergab neben der Bildung großer granulozytärer Aggregate innerhalb der Vasa afferentia der renalen Glomeruli auch vermehrt Fibrinogenpräzipitate bzw. Thrombozytenaggregate, schwerpunkthaft innerhalb der glomerulären Arteriolen sowie der Vasa afferentia. Dies hat die Konsequenz einer Gefäßobstruktion und damit konsekutiv einer Verschlechterung der klinischen Funktionsparameter. Gleichzeitig konnten wir intravasal (glomerulär, peritubulär) eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten und CD45-positiver Leukozyten beobachten. Dieses Ergebnis war für uns unerwartet.

Von Fucoidin ist bekannt, dass es das Leukozyten-rolling dosisabhängig [107] schnell und reversibel [32] hemmt. Die effektive Dosis (ED 50) wurde dabei mit 2,1 bis 2,5 mg/l beschrieben [32, 108]. Um einen therapeutischen Effekt mit einer 90%igen Inhibition der Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion in einem intestinalen Ischämie-/Reperfusionsmodell der Katze zu erreichen, wurde eine Dosis von 25mg/kg/KG verwendet [55]. Eine Konzentration von 360mg/l wurde vorab in einem Ischämie-/Reperfusions-Modell unter Verwendung einer isoliert hämoperfundenen Rattenleber als wirksam die Organfunktion verbessernd, beschrieben [33]. Nebenwirkungen sind in den vorliegenden Studien nicht beobachtet worden.

Im Gegensatz dazu präsentiert unser Modell, bei der verwendeten Dosierung von 100mg/l, eine durch Fucoidin verursachte Formation von intravaskulären Granulozyten- und Thrombozytenaggregaten, mit der Folge lokaler Zirkulationsstörungen sowie einer negativ beeinflussten Organfunktion.



Die in den histologischen Schnittpräparaten beobachteten leukozytären und thrombozytären Aggregate sind sehr wahrscheinlich durch Zell-Zell-vernetzende Fucoidinmoleküle bedingt, da Fucoidin zahlreiche Bindungsstellen für Selektine und möglicherweise noch andere Lektine besitzt [32]. Das gleiche Phänomen wurde vorab in-vitro sowohl an Lymphozyten [109] als auch Thrombozyten [78] ab Fucoidindosen von 5µg/ml beschrieben.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe Bühner et. al. zur homotypischen Granulozytenaggregation in-vitro bestätigen ebenfalls diese Beobachtungen.. Hier konnte, unter Scherstress, die Formation granulozytärer Aggregate aus frischen isolierten, humanen Granulozyten durch Zugabe von Fucoidin in einer Konzentration von 3µg/ml reduziert werden. Mit steigenden Konzentrationen von Fucoidin bis 300 µg/ml war hier die Formation großer Granulozytenaggregate zu beobachten [110]. Die Formation von granulozytären und thrombozytären Mikroaggregaten bewirkt, wie von uns beim Einsatz von Fucoidin beobachtet, einen Anstieg des renalen Perfusionsdruckes, eine erschwerte Organperfusion, sowie eine eingeschränkte Organfunktion [100].

Die in-vitro Experimente zur homotypischen Granulozytenaggregation bestätigen aber auch, dass Fucoidin ein potenter Antagonist der L-Selektin-vermittelten Neutrophilen-Neutrophilen-Aggregation ist [108, 111]. Jedoch wurden diese Effekte der Hemmung der L-Selektin-vermittelten homotypischen Granulozytenadhäsion, sowie der Formation von granulozytären, lymphozytären und thrombozytären Aggregaten bei Fucoidin-Konzentrationen beobachtet, wie sie auch bei in-vivo-Experimenten verwendet wurden.

Neben der fehlenden protektiven Wirkung auf die Nierenfunktion konnte des Weiteren eine scheinbar paradox erhöhte leukozytäre Infiltration des Gewebes in den Fucoidin-behandelten Nieren beobachtet werden. Dieses Phänomen lässt sich über die Obstruktion der kleinen Hämangien, mit konsekutiver Reduktion der renalen Blutflussgeschwindigkeit und damit der Scherraten, erklären, da hierdurch eine Selektin-unabhängige Leukozytenextravasation begünstigt wird [112].

Zusätzlich handelt es sich bei Fucoidin, entgegen anderen exakt definierten biochemischen Substanzen, um eine natürliche Substanz mit variierenden Ladungszuständen [72], welche den Einsatz in der experimentellen Physiologie

möglicherweise negativ beeinflussen können.

Protektive Effekte von Fucoidin auf die Organfunktion wurden beschrieben bei Katzenherzen und postischämischen Venolen von Mäusen [55, 92], Meerschweinchenleber [86] Kaninchenlunge [93], Lämmerherzen [91], diversen Ratten- [84, 85, 87-89, 113] und Mäuseorganen [47, 80, 81], aber erst einmal beim Schwein [94], das auch wir für unser Modell wählten. Literatur über den Einsatz von Fucoidin im Nierenmodell war bis dato nicht erhältlich.

Es stellt sich somit die Frage, ob es möglicherweise eine spezies- oder organabhängige Selektin-vermittelte Leukozytenadhäsion gibt.

Da aber alle untersuchten Spezies eine leukozytäre L-Selektinexpression zeigen, scheint eine organspezifische Selektin-vermittelte Leukozytenadhäsion wahrscheinlich. In der Niere ergibt sich tatsächlich die anatomische Besonderheit zweier hintereinandergeschalteter Kapillarsysteme. Das gleiche Phänomen ist sonst nur noch an der Hypophyse zu beobachten. Zusätzlich besitzt die Niere die Möglichkeit der Autoregulation. Es ergeben sich dadurch veränderte Blutflussbedingungen, wie z. B. im Herzen, oder in der Leber.

Bezüglich der Verteilung von Selektin-Liganden scheinen an der Niere ebenfalls Unterschiede zu bestehen. So wird eine Abwesenheit von L-Selektin-Liganden an den Vasa afferentia der renalen Glomeruli vermutet [114]. Auch innerhalb des glomerulären Kapillarsystems scheint es keine L-Selektin-Liganden zu geben.

Die Leukozytenextravasation findet hier wahrscheinlich nicht über L-Selektin-vermittelte Wege statt, sondern möglicherweise über Zelltransporte und Signaltransduktion, wie erste Publikationen zeigen [115]. In tubulären Strukturen sind dagegen L-Selektin-Liganden nachweisbar [116]. Dadurch lässt sich erklären, weshalb nach experimenteller Ureterobstruktion vermehrt Leukozyten im renalen Interstitium zu finden sind [117].

Weiterhin muss beachtet werden, dass wir mit einem Modell der isolierten Organperfusion gearbeitet haben, wodurch sich deutlich erhöhte Fucoidinkonzentration bezogen auf das Organgewicht, im Gegensatz zum in-vivo-Einsatz ergeben.

Die Wichtigkeit der L-Selektin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion im ex-vivo Perfusionsmodell der Niere scheint zum Teil auch durch ein sekundäres L-Selektin-shedding aufgrund einer mechanischen Alteration der Leukozyten während der Blutgewinnung, sowie durch die Beanspruchung der Leukozyten im Perfusionssystem maskiert zu werden [118-120].

Heparin, von dem gezeigt werden konnte, dass es die Interaktion von L-Selektin mit seinen Liganden stört, zeigt in-vitro nur eine geringe Inhibition der L-Selektin-abhängigen Zell-Zell-Adhäsion bei Konzentrationen wie sie von uns bei der ex-vivo-Perfusion verwendet wurden [121].

Aus dem oben Gesagten lässt sich somit ein enges therapeutisches Fenster beim Einsatz von Fucoidin ableiten, mit der potentiellen Gefahr einer Provokation von thrombotischen und/oder thrombembolischen Ereignissen, mit möglicherweise nachfolgender negativen Beeinflussung der Organfunktion.

Die exakte Klärung der Rolle von Selektinen im Rahmen des renalen Ischämie-/Reperfusionsschaden des Schweines erfordert daher weitere Untersuchungen, möglicherweise unter Einsatz von in-vivo-Experimenten und monoklonaler Antikörper. Hier stellt sich allerdings die Frage nach der ethischen Bedenklichkeit solcher Experimente, der Erhältlichkeit entsprechender Antikörper und den dadurch anfallenden Kosten.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Strategie der Hemmung der Selektin-vermittelten Granulozytenadhäsion durch Fucoidin aufgrund eines erheblichen Potentials zur Bildung von intravaskulären Aggregaten nicht geeignet erscheint, einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens auszuüben. Unsere Beobachtungen stellen somit den experimentellen Gebrauch von Fucoidin als Inhibitor der L-Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion in Frage.

## 6 □ Zusammenfassung

Der renale Ischämie-/Reperfusionsschaden (IRI) stellt in der Transplantationsmedizin ein grosses Problem dar. Fucoidin, ein potenter Antagonist der Selektin-vermittelten Leukozytenaggregation, verbesserte an der Rattenleber (in einer Konzentration von 360mg/l) das Ausmass der leukozytären Gewebeeinfiltration in der frühen Phase nach Ischämie und Reperfusion. In einem Modell der isoliert hämoperfundenen Schweineniere sollte die Wirkung von Fucoidin auf die postischämische Organfunktion untersucht werden. Hierzu wurden 24 Versuche durchgeführt. Dem Blut der Versuchsgruppen wurde vor Beginn der Reperfusion Fucoidin in einer Konzentration von 100 mg/l zugesetzt. Es zeigte sich unter Fucoidin ein signifikanter Abfall des renalen Blutflusses ( $55 \pm 28$  vs.  $143 \pm 97$  ml\*min<sup>-1</sup>\*100g<sup>-1</sup>, p<0,001) und Anstieg des renalen Gefässwiderstandes ( $2,9 \pm 2,8$  vs.  $1,1 \pm 1,5$  mmHg\*ml<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>\*100g<sup>-1</sup>, p<0,001). Zusätzlich war das Ausmass intravasaler und intraparenchymatöser leukozytärer Infiltrate erhöht. Auch wurden vermehrt granulozytäre Aggregate innerhalb der präglomerulären Arteriolen, in den Fucoidin-behandelten Nieren beobachtet (10/12 Nieren in den Fucoidingruppen vs. 2/12 Nieren in den Kontrollen, p<0,001). Signifikant vermehrte Fibrinogenausfällungen und Thrombozytenaggregate innerhalb der glomerulären Arteriolen konnten ebenfalls festgestellt werden. In vitro Versuche zur L-Selektin vermittelten homotypischen Granulozytenaggregation unter Fucoidin zeigen eine Dosis-abhängige Formation granulozytärer Aggregate, auch bei Konzentrationen wie sie bei den reperfundenen Nieren verwendet wurden. Die Potenz zur Formierung granulozytärer Mikroaggregate, sowie die Begünstigung intravasaler Fibrinogenausfällungen und Thrombozytenaggregate stellt die Effektivität von Fucoidin als Inhibitor der Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion Frage.

## 7 Literatur

1. Thadhani, R., M. Pascual, and J.V. Bonventre, *Acute renal failure*. N Engl J Med, 1996. 334(22): p. 1448-60.
2. Martin, X., et al., *Autotransplantation of the kidney in primates: a model of renal damage to study the ischemia-reperfusion injury*. Transplant Proc, 1997. 29(8): p. 3428-9.
3. Shoskes, D.A. and J.M. Cecka, *Effect of delayed graft function on short- and long-term kidney graft survival*. Clin Transpl, 1997: p. 297-303.
4. Isoniemi, H., et al., *Risk factors predicting chronic rejection of renal allografts*. Transplantation, 1994. 57(1): p. 68-72.
5. Baker, G.L., R.J. Corry, and A.P. Autor, *Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase*. Ann Surg, 1985. 202(5): p. 628-41
6. Correias Gomez, M.A., et al., *Role of nitric oxide in warm ischemia of the transplanted kidney*. Arch Esp Urol, 1997. 50(5): p. 495-503.
7. Granger, D.N., M.E. Hollwarth, and D.A. Parks, *Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals*. Acta Physiol Scand Suppl, 1986. 548: p. 47-63.
8. Paller, M.S., J.R. Hoidal, and T.F. Ferris, *Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat*. J Clin Invest, 1984. 74(4): p. 1156-64
9. Clark, E.T., et al., *Endothelial cell response to hypoxia-reoxygenation is mediated by IL-1*. J Surg Res, 1995. 58(6): p. 675-81.
10. Homer Vanniasinkam, S., J.N. Crinnion, and M.J. Gough, *Post-ischaemic organ dysfunction: a review*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997. 14(3): p. 195-203.
11. Seekamp, A. and P.A. Ward, *Ischemia-reperfusion injury*. Agents Actions Suppl, 1993. 41: p. 137-52.
12. Takada, M., et al., *The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand*. J Clin Invest, 1997. 99(11): p. 2682-90

13. Boyle, E.M., Jr., *et al.*, *Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion*. Ann Thorac Surg, 1996. 62(6): p. 1868-75
14. Lefer, A.M., A.S. Weyrich, and M. Buerke, *Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1994. 28(3): p. 289-94.
15. Haab, F., *et al.*, *Improvement of postischemic renal function by limitation of initial reperfusion pressure*. J Urol, 1996. 155(3): p. 1089-93.
16. Frank, R.S., *et al.*, *Ischemia with intermittent reperfusion reduces functional and morphologic damage following renal ischemia in the rat*. Ann Vasc Surg, 1993. 7(2): p. 150-5.
17. Woolfson, R.G., C.G. Millar, and G.H. Neild, *Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction*. Nephrol Dial Transplant, 1994. 9(11): p. 1529-31.
18. Alejandro, V.S., *et al.*, *Postischemic injury, delayed function and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase distribution in the transplanted kidney*. Kidney Int, 1995. 48(4): p. 1308-15.
19. Mazzoni, M.C., *et al.*, *Mechanisms and implications of capillary endothelial swelling and luminal narrowing in low-flow ischemias*. Int J Microcirc Clin Exp, 1995. 15(5): p. 265-70.
20. Riede, S., *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. ed. 1995, Stuttgart: Thieme Verlag.
21. Mandel, L.J., S.P. Soltoff, and P.C. Brazy, *Energy compartmentation and active transport in proximal kidney tubules*. Adv Exp Med Biol, 1986. 194: p. 213-28.
22. Ratych, R.E. and G.B. Bulkley, *Free-radical-mediated postischemic reperfusion injury in the kidney*. J Free Radic Biol Med, 1986. 2(5-6): p. 311-9.
23. Green, C.J., *et al.*, *The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys*. Free Radic Res Commun, 1989. 7(3-6): p. 255-64

24. Hoshino, T., *et al.*, *Ablation of free radical-mediated reperfusion injury for the salvage of kidneys taken from non-heartbeating donors. A quantitative evaluation of the proportion of injury caused by reperfusion following periods of warm, cold, and combined warm and cold ischemia.* Transplantation, 1988. 45(2): p. 284-9
25. Weight, S.C., P.R. Bell, and M.L. Nicholson, *Renal ischaemia--reperfusion injury.* Br J Surg, 1996. 83(2): p. 162-70.
26. Breimer, M.E., *et al.*, *Physiological and Histological Characterisation Of a Pig Kidney In Vitro Perfusion Model For Xenotransplantation Studies.* Scandinavian Journal Of Urology and Nephrology, 1996. 30 (3): p. 213-221.
27. Lin, P.J., *et al.*, *Acute endothelial reperfusion injury after coronary artery bypass grafting.* Ann Thorac Surg, 1994. 58(3): p. 782-8
28. Engler, R.L. and G. Schmid-Schönbein, *Leucocytes in capillary networks.*, in *Physiology and pathophysiology of leucocyte adhesion.*, D.N. Granger and G. Schmid-Schönbein, Editors. 1995, Oxford University Press: Oxford.
29. Gold, R., K.V. Toyka, and H.P. Hartung, *Synergistic effect of IFN-gamma and TNF-alpha on expression of immune molecules and antigen presentation by Schwann cells.* Cell Immunol, 1995. 165(1): p. 65-70.
30. Bevilacqua, M.P., *et al.*, *Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins.* Science, 1989. 243(4895): p. 1160-5.
31. Pigott, R., Power, Ch., *The Adhesion Molecule Facts Book.* Academic Press, New York, 1993.
32. Ley, K., *et al.*, *Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery.* Blood, 1993. 81(1): p. 177-85.
33. Linke, R., F. Wagner, and C. Hammer, *Analysis of the microcirculation during xenogeneic liver perfusion in the guinea pig--rat model. The contribution of leukocytes to the rejection process.* Transpl Int, 1998. 11(1): p. S457-60.
34. Abbassi, O., *et al.*, *Neutrophil adhesion to endothelial cells.* Blood Cells, 1993. 19(2): p. 245-59.

35. Bevilacqua, M., *et al.*, *Selectins: a family of adhesion receptors*. Cell, 1991. 67(2): p. 233.
36. Bevilacqua, M.P. and R.M. Nelson, *Selectins*. J Clin Invest, 1993. 91(2): p. 379-87.
37. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. 84(7): p. 2068-101.
38. McEver, R.P., *Selectins: novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation*. Thromb Haemost, 1991. 65(3): p. 223-8.
39. Adams, D.H. and S. Shaw, *Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migratio*. Lancet, 1994. 343(8901): p. 831-6.
40. Lasky, L.A., *Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response*. Annu Rev Biochem, 1995. 64: p. 113-39.
41. Lasky, L.A., *How integrins are activated*. Nature, 1997. 390(6655): p. 17.
42. Berg, E.L., *et al.*, *L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1*. Nature, 1993. 366(6456): p. 695-8.
43. Picker, L.J., *et al.*, *The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140*. Cell, 1991. 66(5): p. 921-33.
44. Jung, T.M.a.D., M.O., *Rapid modulation of homing receptor (Gp90mel-14) induced by activators of Protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface*. J. Immunol., 1990. 144: p. 3130-3136.
45. Billups, K.L., *et al.*, *Expression of E-selectin mRNA during ischemia/reperfusion injury*. J Lab Clin Med, 1995. 125(5): p. 626-33.
46. Ferrero, E., *et al.*, *Tumor necrosis factor alpha-induced vascular leakage involves PECAM1 phosphorylation*. Cancer Res, 1996. 56(14): p. 3211-5.
47. Kanwar, S., *et al.*, *The association between alpha4-integrin, P-selectin, and E-selectin in an allergic model of inflammation*. J Exp Med, 1997. 185(6): p. 1077-87.



48. Melrose, J., *et al.*, *IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells*. J Immunol, 1998. 161(5): p. 2457-64.
49. von Andrian, U.H., *et al.*, *L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways*. Blood, 1993. 82(1): p. 182-91.
50. Nelson, R.M., *et al.*, *Higher-affinity oligosaccharide ligands for E-selectin*. J Clin Invest, 1993. 91(3): p. 1157-66.
51. Berg, E.L., *et al.*, *Comparison of L-selectin and E-selectin ligand specificities: the L-selectin can bind the E-selectin ligands sialyl Le(x) and sialyl Le(a)*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 184(2): p. 1048-55.
52. Mulligan, M.S., *et al.*, *Protective effects of oligosaccharides in P-selectin-dependent lung injury*. Nature, 1993. 364(6433): p. 149-51.
53. Smith, C.W., *Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation*. Can J Physiol Pharmacol, 1993. 71(1): p. 76-87.
54. Konstantopoulos, K., *et al.*, *Venous levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and beta2-integrin*. Circulation, 1998. 98(9): p. 873-82.
55. Kubes, P., M. Jutila, and D. Payne, *Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion*. J Clin Invest, 1995. 95(6): p. 2510-9.
56. Donnelly, S.C., Haslett, C. *et al.*, *Role of selectins in development of adult respiratory distress syndrome*. Lancet, 1994. 344: p. 215-219.
57. Gearing, A.J., *et al.*, *Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance*. Ann N Y Acad Sci, 1992. 667: p. 324-31.
58. Munro, J.M., *et al.*, *Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues*. Am J Pathol, 1992. 141(6): p. 1397-408.
59. Feizi, T., *Oligosaccharides that mediate mammalian cell-cell adhesion*. Curr. Opin. Struct. Biol., 1993. 3: p. 701-710.

60. Lasky, L.A., *Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation*. Science, 1992. 258(5084): p. 964-9.
61. Imai, Y., L.A. Lasky, and S.D. Rosen, *Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin*. Nature, 1993. 361(6412): p. 555-7.
62. Lasky, L.A., et al., *An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule*. Cell, 1992. 69(6): p. 927-38.
63. Flynn, D.M., et al., *A sialyl Lewis(x)-containing carbohydrate reduces infarct size: role of selectins in myocardial reperfusion injury*. Am J Physiol, 1996. 271(5 Pt 2): p. H2086-96.
64. Arndt, H., et al., *Leucocyte-endothelial cell adhesion in a model of intestinal inflammation*. Gut, 1995. 37(3): p. 374-9.
65. Buerke, M., et al., *Humanized monoclonal antibody DREG-200 directed against I-selectin protects in feline myocardial reperfusion injury*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. 271(1): p. 134-42.
66. Han, K.T., et al., *Sialyl Lewis(x) oligosaccharide reduces ischemia-reperfusion injury in the rabbit ear*. J Immunol, 1995. 155(8): p. 4011-5.
67. Palma Vargas, J.M., et al., *Small-molecule selectin inhibitor protects against liver inflammatory response after ischemia and reperfusion*. J Am Coll Surg, 1997. 185(4): p. 365-72.
68. Takada, M., et al., *Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding*. Transplantation, 1997. 64(11): p. 1520-5.
69. Ginis, I. and A.I. Tauber, *Activation mechanisms of adherent human neutrophils*. Blood, 1990. 76(6): p. 1233-9.
70. Mulligan, M.S., M. Miyasaka, and P.A. Ward, *Protective effects of combined adhesion molecule blockade in models of acute lung injury*. Proc Assoc Am Physicians, 1996. 108(3): p. 198-208.
71. Patankar, M.S., et al., *A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities*. J Biol Chem, 1993. 268(29): p. 21770-21776.

72. Nishino, T., *et al.*, *Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial Fucus vesiculosus fucoidan*. Carbohydr Res, 1994. 255: p. 213-224.
73. Sansrisil, F., *Fucus vesiculosus*. 2000.
74. Collic, S., *et al.*, *Anticoagulant properties of a fucoidan fraction*. Thromb Res, 1991. 64(2): p. 143-154.
75. Sigma-Aldrich, F., *Fucoidin Produktinformation*. 2000.
76. Dace, R., *et al.*, *Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides*. Thrombosis Research, 1997. 87(1): p. 113-121.
77. Doctor, V.M., C. Hill, and G.J. Jackson, *Effect of fucoidan during activation of human plasminogen*. Thrombosis Research, 1995. 79(3): p. 237-247.
78. Durig, J., *et al.*, *Anticoagulant fucoidan fractions from Fucus vesiculosus induce platelet activation in vitro*. Thrombosis Research, 1997. 85(6): p. 479-491.
79. Tuomanen, E., *A spoonful of sugar to control inflammation?* J Clin Invest, 1994. 93(3): p. 917-8.
80. Nasu, T., *et al.*, *Fucoidin, a potent inhibitor of L-selectin function, reduces contact hypersensitivity reaction in mice*. Immunol Lett, 1997. 59(1): p. 47-51.
81. Bartlett, M.R., *et al.*, *Effects of the anti-inflammatory compounds castanospermine, mannose-6-phosphate and fucoidan on allograft rejection and elicited peritoneal exudates*. Immunol Cell Biol, 1994. 72(5): p. 367-74.
82. Malhotra, R., R. Priest, and M.I. Bird, *Role for L-selectin in lipopolysaccharide-induced activation of neutrophils*. Biochemical Journal, 1996. 320(2): p. 589-593.
83. Davenpeck, K.L., *et al.*, *Role of P-selectin in microvascular leukocyte-endothelial interaction in splanchnic ischemia-reperfusion*. Am J Physiol, 1994. 267(2 Pt 2): p. H622-30.
84. Ekman, T., *et al.*, *Blocking of endothelial-leukocyte interaction (rolling) does not improve reflow in the rat gastric mucosa after hemorrhagic shock and retransfusion*. Shock, 1994. 2(4): p. 257-61.

85. Gebb, S.A., *et al.*, *Sites of leukocyte sequestration in the pulmonary microcirculation*. J Appl Physiol, 1995. 79(2): p. 493-7.
86. Linke, R., *et al.*, *Prevention of initial perfusion failure during xenogeneic ex vivo liver perfusion by selectin inhibition*. Transplantation, 1998. 66(10): p. 1265-72.
87. O'Sullivan, N.L. and P.C. Montgomery, *Lymphocyte adhesive interactions with cultured parotid salivary gland epithelial cells from rats*. Oral Microbiol Immunol, 1996. 11(5): p. 337-42.
88. Angstwurm, K., *et al.*, *Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats*. Neurosci Lett, 1995. 191(1-2): p. 1-4
89. Omata, M., *et al.*, *Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 1997. 30(6): p. 717-24
90. Ritter, L.S., J.G. Copeland, and P.F. McDonagh, *Fucoidin reduces coronary microvascular leukocyte accumulation early in reperfusion*. Ann Thorac Surg, 1998. 66(6): p. 2063-71.
91. Miura, T., *et al.*, *Blockade of selectin-mediated leukocyte adhesion improves postischemic function in lamb hearts*. Ann Thorac Surg, 1996. 62(5): p. 1295-300.
92. Ma, X.L., *et al.*, *Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium*. Circulation, 1993. 88(2): p. 649-58.
93. Shimaoka, M., *et al.*, *Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 153(1): p. 307-11.
94. Chauvet, P., *et al.*, *Inhibition of platelet-neutrophil interactions by Fucoidan reduces adhesion and vasoconstriction after acute arterial injury by angioplasty in pigs*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. 34(4): p. 597-603.

95. von Baeyer, H., *et al.*, [A new method of ex vivo whole blood perfusion of isolated mammalian organs, exemplified by the kidney of swine]. Biomed Tech Berl, 1997. 42(3): p. 61-8.
96. Dittrich, S., *et al.*, [Effect of blood viscosity on the function of isolated perfused porcine kidney after cold preservation]. Zentralbl Chir, 1998. 123(7): p. 809-13.
97. Sience, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. <http://www.uiowa.edu/~vpr/research/animal/labrats.htm>, 1996.
98. Cook, D.J., *et al.*, *Cardiopulmonary bypass temperature, hematocrit, and cerebral oxygen delivery in humans*. Ann Thorac Surg, 1995. 60(6): p. 1671-7.
99. Rochon, Y.P. and M.M. Frojmovic, *Dynamics of human neutrophil aggregation evaluated by flow cytometry*. J Leukoc Biol, 1991. 50(5): p. 434-43.
100. Dittrich, S., *et al.*, *Hemodilution improves organ function during normothermic cardiopulmonary bypass - investigations in isolated perfused pig kidneys*. Perfusion, 2000.
101. Mertzlufft, F., *et al.*, *Reliability of the heparin management test for monitoring high levels of unfractionated heparin: in vitro findings in volunteers versus in vivo findings during cardiopulmonary bypass*. Anesthesiology, 2000. 92(6): p. 1594-602.
102. Romeis, B., *Mikroskopische Technik*. Urban & Schwarzenberg ed, ed. P. Böck. 1989: Böck, P.
103. Binns, R.M., *et al.*, *Genetically determined CD45 variant of value in leucocyte tracing in vivo in the pig*. Immunology, 1995. 86(1): p. 25-33.
104. Clemmensen, I., *Three new E-antigenic fibrinogen fractions found in a commercial plasmin preparation*. Science Tools, LKB Instr J, 1973. 20: p. 7-8.
105. O'Toole, E.T., R.R. Hantgan, and J.C. Lewis, *Localization of fibrinogen during aggregation of avian thrombocytes*. Exp Mol Pathol, 1994. 61(3): p. 175-90.
106. Matsuno, H., *et al.*, *Effect of GR144053, a fibrinogen-receptor antagonist, on thrombus formation and vascular patency after thrombolysis by tPA in the injured carotid artery of the hamster*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. 32(2): p. 191-7.

107. Varki, A., *Selectin ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(16): p. 7390-7.
108. Rochon, Y.P., *et al.*, *A role for lectin interactions during human neutrophil aggregation*. J Immunol, 1994. 152(3): p. 1385-93.
109. Swarte, V.V., *et al.*, *L-selectin-mediated lymphocyte aggregation: role of carbohydrates, activation and effects on cellular interactions*. Cell Adhes Commun, 1998. 6(4): p. 311-22.
110. Gratopp, A., *Messung L-Selektin-abhängiger Adhäsionsprozesse mit Hilfe eines homotypischen Aggregationsassays*. Dissertationsschrift aus der Abt. f. Neonatologie, Medizinische Fakultät Charité, der Humboldt-Universität zu Berlin, 2000.
111. Simon, S.I., *et al.*, *Beta 2-integrin and L-selectin are obligatory receptors in neutrophil aggregation*. Blood, 1993. 82(4): p. 1097-106.
112. Gaboury, J.P. and P. Kubes, *Reductions in physiologic shear rates lead to CD11/CD18-dependent, selectin-independent leukocyte rolling in vivo*. Blood, 1994. 83(2): p. 345-50.
113. Davenpeck, K.L., *et al.*, *P- and L-selectin mediate distinct but overlapping functions in endotoxin-induced leukocyte-endothelial interactions in the rat mesenteric microcirculation*. J Immunol, 1997. 159(4): p. 1977-86.
114. De Vriese, A.S., *et al.*, *The role of selectins in glomerular leukocyte recruitment in rat anti- glomerular basement membrane glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 1999. 10(12): p. 2510-7.
115. Rabb, H. and G. Postler, *Leucocyte adhesion molecules in ischaemic renal injury: kidney specific paradigms?* Clin Exp Pharmacol Physiol, 1998. 25(3-4): p. 286-91.
116. Kawashima, H., *et al.*, *Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. I. Versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan, is a ligand for L-selectin*. Int Immunol, 1999. 11(3): p. 393-405.

117. Shikata, K., *et al.*, *L-selectin and its ligands mediate infiltration of mononuclear cells into kidney interstitium after ureteric obstruction*. J Pathol 1999 May;188(1):93-99, 1999. May; 188(1)(1): p. 93-99.
118. el Habbal, M.H., *et al.*, *Neutrophil activation in paediatric extracorporeal circuits: effect of circulation and temperature variation*. Cardiovasc Res, 1995. 29(1): p. 102-7.
119. Himmelfarb, J., P. Zaoui, and R. Hakim, *Modulation of granulocyte LAM-1 and MAC-1 during dialysis--a prospective, randomized controlled trial*. Kidney Int, 1992. 41(2): p. 388-95.
120. Thylen, P., *et al.*, *Cell surface receptor modulation on monocytes and granulocytes during clinical and experimental hemodialysis*. Am J Nephrol, 1995. 15(5): p. 392-400.
121. Nelson, R.M., *et al.*, *Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation*. Blood, 1993. 82(11): p. 3253-8.

## 9 Publikationen

### Kongressbeiträge/Abstracts/reguläre Artikel

1. Schaeper F., Lippek F., Krabatsch T., Bluemcke S.  
Results of histomorphological and histomorphometrical investigations of left ventricular myocardium after transmyocardial laser revascularisation (TMLR)  
1<sup>st</sup> Intern. Congress on Coronary Artery Disease, Prague 1997,  
American College of Cardiology, Suppl., Anaheim, California, March 1997
2. Lippek F., Dittrich S., v. Loeper J., Aurich H., Grosse-Siestrup C., Dietel M., Lange P.E.  
Die regionale HLA-DR-Expression steigt mit der Dauer der  
Kältekonservierung bei explantierten Schweinenieren  
Symposium Xenotransplantation, Rauschholzhausen 1998
3. v. Baeyer H., Stahl K., Schäper F., Lippek F., Grosse-Siestrup C., Schnoy H.  
Licht- und elektronenmikroskopische Morphologie der hyperakuten  
Abstoßungsreaktion bei humanblutperfundierten Schweinenieren: Ansätze zu  
ihrer Überwindung  
Symposium Xenotransplantation, Rauschholzhausen 1998
4. Dittrich S., Lippek F., v. Loeper J., Aurich H., Grosse-Siestrup C., Lange P.E.  
Die Hemmung der Leukozytenmigration durch Fucoidan führt nicht zur  
Verbesserung der Nierenfunktion in der frühen Reperfusionsphase nach  
Ischämie  
Symposium Xenotransplantation, Rauschholzhausen 1998



5. v. Loeper J., Dittrich S., Aurich H., Lippek F., Schuth A., Meissler M., Lange P.E.

Physiological characterization of cold storage after cadaver explantation in the isolated perfused pig kidney

GV-SOLAS, Society for Laboratory Animal Science, Hamburg, 1998,

<http://www.isolated-organs.de>, ISBN 0-901334-12-X

6. Lippek F., Holland G., Stahl K., Große-Siestrup C., v. Baeyer H.

The hyperacute rejection in a xenoperfusion model of pig kidney

GV-SOLAS, Society for Laboratory Animal Science, Hamburg, 1998,

<http://www.isolated-organs.de>, ISBN 0-901334-12-X

7. v. Loeper J., Dittrich S., Aurich H., Lippek F., Schuth A., Meissler M., Lange PE.

Physiological and histological characterization of cold storage after cadaver explantation in the isolated perfused pig kidney.

25th Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO),

Bologna, 11.-13.11.1998. Int J Artif Organs 1998; 21; 608.

8. Stawowy P., Grill M., Riggers U, Lippek F, Wollert B., Gräfe M, Graf K.

Myokardiale Osteopontinexpression ist erhöht bei Patienten mit DKMP und linksventrikulärer Hypertrophie

Deutscher Kongress für Kardiologie, Mannheim 1998

9. Ruhnke M; Eichenauer E., Searle J., Lippek F.

Fulminant Tracheobronchial and Pulmonary Aspergillosis Complicating Imported Plasmodium falciparum Malaria in an Apparently Immunocompetent Woman.

Clin Infect Dis. 2000 Jun;30(6): 938-940.PMID: 10880305

10. Lippek F., Dittrich S., Nogueira A., Hegemann O., Koios D., v. d. Groeben J., Grosse – Siestrupp C., Lange P.E.  
Pulmonaler Ischämie-/Reperfusionsschaden – Eine Analyse an der isoliert hämoperfunden Schweinelunge  
2. Workshop des DVG Arbeitskreises „Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems“, Kiel 2000
11. v. Engelhardt A., Dittrich S., Lippek F., Hegemann O., Koios D., v.d. Groeben J., Grosse-Siestrup C. and Lange, P.E.  
An alternative investigation method for animal experiments in ischemia/reperfusion injury. The use of pig lungs and blood from slaughterhouse for isolated organ perfusion  
GV-SOLAS, Society for Laboratory Animal Science, Seminar on Isolated Perfused Organs, Essen, 2000, <http://www.isolated-organs.de>
12. Brümmer D., Riggers U., Holzmeister J., Ludewig B., Grill M., Lippek F., Settmacher U., Regitz-Zagrosek V., Fleck, E. Graf K.  
Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with the early development of human atherosclerotic lesions  
American journal of cardiology, 2000 (akzeptiert zur Publikation)

## **10 Danksagung**

Ich danke allen, die mich bei dieser Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben. Insbesondere Herrn K.-H. Friedrich für die guten Tipps bei der Anfertigung der immunhistologischen Färbungen sowie den Damen des Eingangslabors des Institutes für Pathologie, Virchow – Klinikum, für die Hilfe bei der Durchführung der „Routinefärbungen“. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. P. E. Lange für die Bereitstellung des Themas. Und zu guter Letzt gilt mein größer Dank meinem Betreuer Dr. Sven Dittrich, von dem ich sehr viel gelernt habe und der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für die hervorragende Betreuung!

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 15.11.2000